

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant: Eberhard WEIHE et al.
Serial No.: To Be Assigned Group Art Unit: To Be Assigned
Filed: December 15, 2003 Examiner: To Be Assigned
Title: SCREENING METHOD USING BNPI AND DNPI

CLAIM FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. §119

Mail Stop PATENT APPLICATION

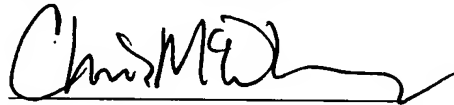
Director of the USPTO
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Sir:

The benefit of the filing date of prior foreign application No. 101 28 541.8, filed in Federal Republic of Germany on June 13, 2001, is hereby requested and the right of priority under 35 U.S.C. §119 is hereby claimed.

In support of this claim, filed herewith is a certified copy of the original foreign application.

Respectfully submitted,



J. D. Evans
Registration No. 26,269

Christopher T. McWhinney
Registration No. 42,875

Date: December 15, 2003

CROWELL & MORING, LLP
P.O. Box 14300
Washington, DC 20044-4300
Telephone No.: (202) 624-2500
Facsimile No.: (202) 628-8844

JDE/CTM/lw

295184

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 101 28 541.8

Anmeldetag: 13. Juni 2001

Anmelder/Inhaber: Grünenthal GmbH, Aachen/DE

Bezeichnung: Screeningverfahren mit BNPI und DNP

IPC: C 12 Q 1/02

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 11. November 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

Schmidt C.

Screeningverfahren mit BNPI und DNPI

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auffindung schmerzregulierender Substanzen unter Verwendung von BNPI und/oder DNPI und die Verwendung dadurch identifizierter Verbindungen, an BNPI und/oder DNPI bindender Wirkstoffe, gegen BNPI und/oder DNPI gerichteter Antikörper, von Antisensenukleotiden gegen BNPI und/oder DNPI, oder von BNPI und/oder DNPI bzw. Teilproteinen davon, bzw. entsprechenden Polynukleotiden für Arzneimittel zur Schmerztherapie und Diagnostika.

15 Zur Therapie von Schmerzen stehen unterschiedliche Arzneimittel zur Verfügung wie z.B. Acetylsalicylsäure, Paracetamol, Dipyrone, Tramadol, Morphin und Fentanyl; aber auch Substanzen wie Amitryptilin und Ketamin kommen zur Behandlung von Schmerzpatienten zum Einsatz. Trotz
20 zunehmend verfeinerter Therapieschemata kann jedoch insbesondere bei chronischen Schmerzzuständen oft keine dauerhafte Verbesserung für die Patienten erzielt werden. Hierfür ist unter anderem auch die Tatsache verantwortlich, daß es beim chronischen Schmerz zu dauerhaften Veränderungen beteiligter Nervenzellen kommt.

25 Die Schmerzforschung der letzten Jahre erbrachte die grundlegende Erkenntnis, daß der Entwicklung gerade chronischer Schmerzzustände plastische Veränderungen des Nervensystems, insbesondere in den nozizeptiven Neuronen der Hinterwurzelganglien und der Neurone im Bereich der Dorsalhörner des Rückenmarks, zugrunde liegen (als Überblick
30 siehe: Coderre et al. 1993; Zimmermann & Herdegen, 1996). Die neuronale Plastizität geht einher mit Veränderungen in der Expression bestimmter Gene und führt zur langanhaltenden Veränderung des Phänotyps der

5 betroffenen Neuronen. Das Konzept der neuronalen Plastizität wurde bisher vor allem auf Entwicklungs-, Lern- und Regenerationsprozesse angewandt, doch die neueren Befunde aus der Schmerzforschung zeigen, daß dieses Konzept auch bei pathophysiologischen Vorgängen greift (Tölle, 1997).

Die Chronifizierung des Schmerzes ist tierexperimentell auf phänomenologischer Ebene bereits relativ gut charakterisiert. Die Induktion chronischer Schmerzzustände führt zu folgenden Veränderungen:

- Erhöhte Empfindlichkeit und verringerte Reizschwelle peripherer Nozizeptoren
- Aktivierung sogenannter stiller Nozizeptoren
- Reorganisation rezeptiver Felder
- Erregbarkeitszunahme im Rückenmark.

15

Diese plastischen Veränderungen sind sowohl für die in den Ganglien vorkommenden primären Afferenzen, als auch für die im Rückenmark lokalisierten nachgeschalteten Neurone beschrieben worden und werden auch supraspinal z. B. im Thalamus vermutet. In Analogie zu den für Lern- und Gedächtnisprozesse beschriebenen Mechanismen ist anzunehmen, daß in den beteiligten Zellen ein spezifisches Genprogramm abläuft, das die koordinierte Regulation relevanter Gene beinhaltet, deren Expression dann maßgeblich zur pathophysiologischen Ausprägung chronischer Schmerzen beiträgt.

25

Ausgangspunkt der Erfindung war daher die Identifizierung derartiger schmerzregulierter, die in ihrer Expression unter Schmerzbedingungen verändert und deshalb wahrscheinlich an der Entstehung und Verarbeitung von insbesondere chronischen Schmerzen beteiligt sind, über ihre Regulationszusammenhänge.

30

Für eine Reihe bekannter Gene wurde bereits eine Regulation in verschiedenen Schmerzmodellen nachgewiesen (s. Tabelle 1), so zum Beispiel für Neurotransmitter (Substanz P, CGRP), Rezeptoren (Substanz P-Rezeptor, μ , κ , δ -Opiatrezeptoren, NMDA-Rezeptor) und Transkriptionsfaktoren (cJun, JunB, cFos oder Krox24). Die Tatsache, daß die genannten Rezeptoren bereits als molekulare Targets für die Entwicklung neuer Analgetika verwendet werden (Dickenson, 1995), gibt einen deutlichen Hinweis darauf, daß auch die Identifizierung neuer schmerzregulierter Gene für die Entwicklung von Analgetika, insbesondere für entsprechende Screeningverfahren, von großem Interesse ist. Die zentrale Idee ist hierbei, die Entstehung oder Persistenz von Schmerzen, insbesondere chronischer Art, zu unterbrechen, indem solche Proteine in ihrer Funktion beeinflusst werden, die in Schmerz-Zuständen verstärkt oder vermindert gebildet werden.

Tabelle 1: Regulation bekannter Gene/Genprodukte in Schmerz-Tiermodellen

Gen(produkt)	Reg	Gewebe/Zelle	Modell	Literatur
(a) Neurotransmitter				
CGRP	↑	RM-Dorsalhorn	UV-Bestrahlung der Haut	Gillardon F et al. (1992) Ann NY Acad Sci 657: 493-96
Preprotachykinin & CGRP-mRNA	↑	DRG	Monoarthritis	Donaldson LF et al. (1992) Mol Brain Res 16: 143-49
Preprotachykinin -mRNA	↑	RM-Dorsalhorn	Formalin	Noguchi & Ruda (1992) J Neurosci 12:2563-72
Prodynorphin mRNA	↑	Rückenmark	Exp Arthritis	Höllt et al (1987) Neurosci Lett 96:247-52
Dynorphin Prot.	↑	Rückenmark	Formalin	Ruda et al. (1988) PNAS 85: 622-26
Substanz P	↑	Nozizeptoren	Exp. Arthritis	Levine JD et al. (1984) Science 226:547-49
(b) Neurotrophine				
BDNF mRNA & Immunreaktivität	↑	DRG: trkA+ Zellen	i. th. NGF Inj.	Michael GC et al. (1997) J Neurosci 17: 8476-90
(c) Rezeptoren				
μ, κ, δ-Bindung	↓ ↑	RM-Dorsalhorn	Monoarthritis	Besse D et al. (1992) Eur J Pharmacol 223:123-31
μ-Opiatrezeptor-Immunreaktivität	↑	DRG	Carageenan ind. Entzündung	Ji R-R et al. (1995) J Neurosci 15: 8156-66
κ & δ-Opiatrez.-mRNA	↓	DRG	Carageenan ind. Entzündung	Ji R-R et al. (1995) J Neurosci 15: 8156-66
κ & μ-Opiatrezeptor-mRNA	↑	RM-Dorsalhorn	Monoarthritis	Maekawa K et al. (1995) Pain 64:365-71
CCK _B -Rez. mRNA	↑	DRG	Axotomie	Zhang X et al. (1993) Neuroscience 57: 227-233
NMDA-R1-mRNA	↓	RM-Dorsalhorn Laminae I & II	CFA-induzierte Entzündung	Kus L et al. (1995) Neuroscience 68: 159-65
(d) Enzyme				
NADPH-Diaphorase Aktivität	↑	RM-Dorsalhorn	Ischiaticus-Transektion	Fiallos-Estrada et al. ('93) Neurosci Lett 150: 169-73
NADPH-Diaphorase	↑	Rückenmark	Formalin	Solodkin et al. 1992 Neurosci 51: 495-99
NO-Synthetase mRNA	↑	DRG	Axotomie	Verge VMK et al. (1992) PNAS 89: 11617-62
NO-Synthetase Protein	↑	RM-Dorsalhorn	Formalin	Herdegen et al. (1994) Mol Brain Res 22:245-58
NO-Synthetase-Immunreaktivität	↑	DRG	Ischiaticus-Transektion	Fiallos-Estrada et al. ('93) Neurosci Lett 150: 169-73
(e) Signalkaskade				
rap1A, rap1B, H-ras mRNA	↑	Rückenmark	Formalin	Urayama O et al. (1997) Mol Brain Res 45:331-34
PKC-Bindung	↑	RM-Dorsalhorn	CFA-induzierte Monoarthritis	Tölle TR et al (82) J Neurol 242(S2):135
(f) Transkriptionsf.				
cFOS	↑	Rückenmark	Noxische Stimulierung	Hunt SP et al. (1987) Nature 328: 632-34
cJun, JunB, cFOS	↑	RM-Dorsalhorn	Formalin	Herdegen T et al. (1994) Mol Brain Res 22: 245-48
Krox24				

RM, Rückenmark; DRG, Dorsal Root Ganglia; CFA, Complete Freund Adjuvans; NGF, Nerve Growth Factor.

Daraus folgend war primäre Aufgabe der Erfindung, ein Screeningverfahren zur Identifizierung im Schmerz relevanter, insbesondere schmerzregulierender Substanzen zu entwickeln. Die Erfindung betrifft daher ein Verfahren zur Auffindung schmerzregulierender Substanzen mit folgenden Verfahrensschritten:

- 10 (a) Inkubation einer zu testenden Substanz unter geeigneten Bedingungen mit dem Protein BNPI oder DNPI und/oder einem Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder einem zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder deren Antisense Polynukleotide binden, oder einem mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine und/oder einer Zelle und/oder einer Präparation aus einer solchen Zelle, die mindestens eines der vorgenannten Proteine und Teilproteine synthetisiert hat,
- 15 20
- 25 (b) Messung der Bindung der Testsubstanz an dem von der Zelle synthetisierten Protein oder Teilprotein oder Messung mindestens eines der durch die Bindung der Testsubstanz an das Protein oder Teilprotein veränderten funktionellen Parameter.
- 30 Dieses neuartige Screeningverfahren basiert darauf, daß hier eine potentielle Schmerz-Wirksamkeit einer Substanz über ihre Wechselwirkung

mit einer schmerzregulierten Proteinstruktur, BNPI oder DNPI oder verwandte Strukturen, aufgefunden werden kann.

5 Dabei bezieht sich der Begriff schmerzregulierend auf einen potentiellen regulierenden Einfluß auf das physiologische Schmerzgeschehen, insbesondere auf eine analgetische Wirkung. Der Begriff Substanz umfaßt jede als Arzneimittel-Wirkstoff geeignete Verbindung, insbesondere also niedermolekulare Wirkstoffe, aber auch andere wie Nukleinsäuren, Fette, Zucker, Peptide oder Proteine wie Antikörper.

10

Die Inkubation unter geeigneten Bedingungen ist hier so zu verstehen, daß die zu untersuchende Substanz mit der Zelle oder der entsprechenden Präparation in einem wässrigen Medium eine definierte Zeit vor der Messung reagieren kann. Dabei kann das wässrige Medium temperiert werden, beispielsweise zwischen 4°C und 40°C, vorzugsweise bei Raumtemperatur oder bei 37°C. Die Inkubationszeit kann zwischen wenigen Sekunden und mehreren Stunden variiert werden, je nach der Wechselwirkung der Substanz mit dem Teilprotein oder Protein. Bevorzugt sind aber Zeiten zwischen 1 min und 60 min. Das wäßrige Medium kann 15 geeignete Salze und/oder Puffersysteme enthalten, so daß bei der Inkubation beispielsweise ein pH zwischen 6 und 8, vorzugsweise pH 7,0 - 20 7,5 im Medium herrscht. Dem Medium können weiter geeignete Substanzen, wie Coenzyme, Nährstoffe etc. beigefügt werden. Die geeigneten Bedingungen können vom Fachmann in Abhängigkeit von der zu untersuchenden Wechselwirkung der Substanz mit dem Teilprotein oder 25 Protein aufgrund seiner Erfahrung, der Literatur oder weniger, einfacher Vorversuche leicht festgelegt werden, um im Verfahren einen möglichst deutlichen Meßwert zu erhalten.

30

Eine Zelle, die ein bestimmtes Teilprotein oder Protein synthetisiert hat, ist eine Zelle, die dieses Teilprotein oder Protein bereits endogen exprimiert hat oder eine solche, die gentechnisch verändert wurden, so daß sie dieses

Teilprotein oder Protein exprimiert und entsprechend vor Beginn des erfindungsgemäßen Verfahrens das Teilprotein oder Protein enthält. Die Zellen können Zellen aus evt. immortalisierten Zelllinien sein oder native aus Geweben stammende und aus diesen isolierte Zellen sein, wobei der Zellverband meist aufgelöst ist. Die Präparation aus diesen Zellen umfaßt insbesondere Homogenate aus den Zellen, das Cytosol, eine Membranfraktion der Zellen mit Membranfragmenten, eine Suspension isolierter Zellorganellen etc.

Die hier aufgezählten Proteine und Teilproteine wurden im Rahmen dieser Erfindung als durch Schmerz reguliert oder schmerzrelevant verteilt identifiziert, in dem in einem Tier Schmerz ausgelöst wurde und nach angemessener Zeit durch Schnitte im Rückenmark das Expressionsmuster des Tieres mit denen eines Kontroll-Tieres ohne schmerzauslösende Maßnahmen verglichen. Die dabei gefundenen verändert exprimierten sind BNPI sowie insbesondere bezüglich der schmerzrelevanten Verteilung die DNPI.

Aus welcher Spezies diese Proteine stammen, ist für die Funktion des Verfahrens unerheblich, es ist aber bevorzugt, die humane, Maus- oder Ratten-Variante zu verwenden. BNPI und DNPI sind in Hinblick auf die kodierende DNA- und die Aminosäure-Sequenz bekannt und auch in Ihrer generellen Funktion beschrieben. BNPI, der „brain Na⁺ dependent inorganic phosphate cotransporter“ ist in der WO 96/34288 beschrieben und der DNPI, der „differentiation-associated Na⁺ dependent inorganic phosphate Cotransporter“, wurde von Aihara et al. (2000) im J. Neurochem. 74, 2622-2625 beschrieben.

Keiner dieser Transporter wurde aber bisher im Stand der Technik in einen Zusammenhang mit Schmerz und insbesondere der Schmerzregulation gebracht. Da hier die Identifizierung der Proteine über eine Veränderung der Expression oder die Expressionsverteilung in einem In-vivo-Schmerzmodell erfolgte, hat das daraus abgeleitete erfindungsgemäße

Screening-Verfahren für zukünftige Arzneimittel unter Verwendung dieser Proteine den erheblichen Vorteil, nicht nur auf theoretischen Überlegungen aufzubauen, sondern vermutlich eine starke In-vivo-Relevanz zu besitzen. Da mit diesem Verfahren die Wechselwirkung von Substanzen mit im Schmerzbereich bisher nicht verwendeten Proteinen und Peptiden als Maßstab für das Auffinden schmerzregulierender Substanzen ermöglicht wird, sind mit diesem Verfahren jetzt möglicherweise schmerzrelevante Substanzen aufzufinden, die bei den im Stand der Technik bisher bekannten Verfahren mit anderen Peptiden oder Proteinen nicht aufgefallen wären. Auch dies ist ein erheblicher Vorteil des neuen erfindungsgemäßen Verfahrens.

Der Maßstab über den das Verfahren die Auffindung interessanter Substanzen erlaubt, ist entweder die Bindung an das Protein oder Teilprotein, die z.B. durch Verdrängung eines bekannten Liganden oder das Ausmaß gebundener Substanz nachgewiesen werden kann, oder die Veränderung eines funktionellen Parameters durch die Wechselwirkung der Substanz mit dem Teilprotein oder Protein. Diese Wechselwirkung kann insbesondere in einer Regulation, Hemmung und/oder Aktivierung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen liegen und veränderte funktionelle Parameter können beispielsweise die Genexpression, das Ionenmilieus, der pH oder das Membranpotentials, bzw. die Veränderung der Enzymaktivität oder der Konzentration der 2nd messenger sein.

Zur Erläuterung der Erfindung werden im folgenden neben den im allgemeinen Text zu Begriffen gegebenen Erklärungen weitere Definitionen angegeben, um klarzustellen, wie bestimmte, insbesondere in den Ansprüchen verwendete Begriffe im Sinne dieser Erfindung zu verstehen und auszulegen sind.

- Substanz: Damit ist eine chemische Verbindung gemeint. Hier handelt es sich im engeren Sinne um Verbindungen, die potentiell eine Wirkung

im Körper entfalten können, niedermolekulare Wirkstoffe, Nukleinsäuren, Fette, Zucker, Peptide oder Proteine, insbesondere hier niedermolekulare Wirkstoffe.

- 5 - schmerzregulierend: Im Sinne der Erfindung heißt schmerzregulierend, daß die Substanz die Wahrnehmung von Schmerz direkt oder indirekt beeinflusst, insbesondere natürlich analgetisch wirkt.

- 10 - Schmerz: Im Sinne der Erfindung bedeutet Schmerz insbesondere ein Schmerzempfinden, präziser akuter, chronischer, neuropathischer und entzündlicher Schmerz inclusive Migräne, insbesondere ist der Schmerz zugehörig zu folgenden Arten:

15 chronischem Schmerz, insbesondere muskuloskelettalem Schmerz; neuropathischem Schmerz, insbesondere allodynischem Schmerz, mechanischer Hyperalgesie oder diabetischer Neuropathie; viszeralem Schmerz, cerebralem Schmerz, peripherem Schmerz oder entzündungsbedingtem Schmerz, insbesondere peripherem Entzündungsschmerz; sowie
20 Migräne, Cluster-Kopfschmerz oder den Schmerz bei Trigeminus Neuralgie.

- 25 - Inkubation: Unter Inkubation ist das Einbringen und Belassen eines biologischen Untersuchungsobjektes, beispielsweise einer Zelle oder eines Proteins, in einem temperierten Medium wie in einem Brutschrank oder auf einem Wasserbad zu verstehen. Dabei heißt hier unter geeigneten Bedingungen eine Inkubation unter physiologischen Bedingungen (z.B. 37°C pH7,2) oder bei den Bedingungen, bei denen eine optimale Messung im Verfahren möglich wird.

- 30 - Zelle: Die Zelle ist ein sich selbst regulierendes, offenes, mit seiner Umgebung durch permanenten Stoffaustausch in einem

Fließgleichgewicht stehendes System mit eigenem Stoffwechsel, und Vermehrungsfähigkeit. Die Zelle kann separat kultiviert oder Teil eines Gewebes, insbesondere aus einem Organ, sein, und dort vereinzelt oder noch im Zellverband vorliegen.

5

- Präparation aus einer Zelle: Darunter versteht man Präparate, die mittels chemischer, biologischer, mechanischer oder physikalischer Methoden unter Änderung der Zellstruktur hergestellt werden, beispielsweise Membranfragmente, isolierte Zellkompartimente, isoliertes Cytosol, oder aus Gewebe gewonnenes Homogenat.

10

- Peptid: Verbindung aus über peptidische Bindungen zu Ketten verknüpften Aminosäuren. Ein Oligopeptid besteht aus zwischen 2 und 9 Aminosäuren, ein Polypeptid aus zwischen 10 und 100 Aminosäuren.

15

- Protein: Verbindung aus über peptidische Bindungen zu Ketten verknüpften mehr als 100 Aminosäuren u.U. mit einer definierten Raumstruktur.

20

- Teilprotein: Verbindung aus über peptidische Bindungen zu Ketten verknüpften mehr als 10 Aminosäuren u.U. mit einer definierten Raumstruktur aber ausgeschnitten bzw. ausgewählt aus einem definierten Protein. Ein Teilprotein kann ein Peptid sein.

25

- PIM1-Kinase; PIM3-Kinase: Ein Proto-Oncogen und eine Serin-Threonin-Kinase.

30

- Polynukleotid: Das zugrundeliegende Nukleotid ist ein grundsätzlich aus Nucleinbase, Pentose und Phosphorsäure bestehender Grundbaustein der Nucleinsäuren. Diese entspricht einem hochmolekularen Polynucleotid aus mehreren Nukleotiden, die über Phosphorsäure-Pentose-Veresterung miteinander verknüpft sind. Unter dieser Erfindung

fallen aber auch modifizierte Polynukleotide, die zwar die Basenabfolge beibehalten, aber über ein modifiziertes Rückrat statt der Phosphorsäure-Pentose verfügen.

- 5 - zu mindestens 90 (95, 97)% ähnlich: Darunter ist zu verstehen, daß die mit erfaßten Polynukleotide in ihrem kodierenden Bereich bezüglich der Basenabfolge zu mindestens 90% (95%, 97%) identisch mit der Referenz (Abbildung etc.) sind und die mit erfaßten Peptide und Proteine in ihrer Primärstruktur, der Abfolge der Aminosäuren zu
- 10 mindestens 90% (95%, 97%) mit der Referenz identisch sind.
- Gen: Mit dem Begriff Gen wird ein Genomabschnitt mit einer definierten Nukleotidsequenz bezeichnet, der die Information zur Synthese einer m- oder prä-mRNA oder einer sonstigen RNA (z.B. tRNA, rRNA, snRNA etc.) enthält. Es besteht aus kodierenden und nicht kodierenden
- 15 Abschnitten.
- Genfragment: Nukleinsäureabschnitt, der in seiner Basenabfolge einen Teilbereich eines Gens beinhaltet
- 20
- Bindung an das Peptid, Teilprotein oder Protein: Wechselwirkung zwischen Substanz und Peptid, Teilprotein oder Protein, die zu Fixierung führt.
- 25
- funktionelle Parameter: darunter versteht man Meßgrößen eines Experimentes, die mit der Funktion eines Proteins (Ionenkanal, Rezeptor, Enzym) korrelieren
- 30
- gentechnisch manipuliert: Manipulation von Zellen, Geweben oder Organismen derart, daß hier genetisches Material eingebracht wird

- endogen exprimiert: Expression eines Proteins, die eine Zelllinie unter geeigneten Kulturbedingungen aufweist, ohne dass dieses entsprechende Protein durch gentechnische Manipulation zur Expression veranlasst wurde
- G-Protein: International übliche Abkürzung für ein Gunaosintriphosphat (GTP)-bindendes Protein, das als Signalprotein durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert wird
- Reporter-gen: Generelle Bezeichnung für Gene, deren Genprodukte sich mit Hilfe einfacher biochemischer Methoden oder histochemischer Methoden einfach nachweisen lassen, wie z.B. Luziferase, alkalische Phosphatase oder Green Fluorescent Protein (GFP).
- (rekombinantes) DNA-Konstrukt: Generelle Bezeichnung für jede Art von DNA-Molekülen, die durch die in vitro-Verknüpfung von DNA-Molekülen entstanden sind.
- Klonierungsvektor: Generelle Bezeichnung für Nukleinsäure-Moleküle, die beim Klonieren als Träger von Fremdgenen oder Teilen dieser Gene dienen.
- Expressionsvektor: Bezeichnung für speziell konstruierte Klonierungsvektoren, die nach Einbringen in eine geeignete Wirtszelle die Transcription und Translation des in den Vektor einklonierten Fremdgens erlauben.
- LTR-Sequenz: Abkürzung für Long terminal repeat. Generelle Bezeichnung für längere Sequenzbereiche, die an beiden Enden eines linearen Genoms zu finden sind. Derartige Sequenzbereiche kommen z.B. in den Genomen von Retroviren und an den Enden eukaryontischer Transposons vor.

- Poly-A-Schwanz: die am 3'-Ende von messenger-RNAs durch Polyadenylierung angehefteten Adenyl-Reste (ca. 20-250).
- 5 - Promotor-Sequenz: Bezeichnung für einen DNA-Sequenzbereich, von dem aus die Transkription eines Gens, d.h. die Synthese der mRNA, gesteuert wird.
- 10 - ORI-Sequenz: Abkürzung für Origin of replication. Die ORI-Sequenz erlaubt einem DNA-Molekül, sich als autonome Einheit in der Zelle zu vermehren.
- 15 - Enhancer-Sequenz: Bezeichnung für relativ kurze, zum Teil als Repetitionen auftretende, genetische Elemente, die in der Regel die Expression mancher Gene in unterschiedlichem Maße verstärken.
- 20 - Transkriptionsfaktor: Bezeichnung für ein Protein, das über eine Bindung an spezifische DNA-Sequenzen, die Transkription eines Gens beeinflusst.
- 25 - kultivieren: Zellen oder Gewebe unter geeigneten Kulturbedingungen halten
- 30 - Bedingungen, die eine Expression erlauben, darunter versteht man die Auswahl und Anwendung von Kulturbedingungen die eine Expression des interessierenden Proteins erlauben, darunter gehören Temperaturänderung, Mediumwechsel, Zusatz von induzierenden Substanzen, Weglassen hemmender Substanzen.
- Inkubationszeit: Zeitdauer für die Zellen oder Gewebe inkubiert, d.h. einer definierten Temperatur ausgesetzt werden.

- Selektionsdruck: Anwendungen von Kulturbedingungen die Zellen mit einem bestimmtem Genprodukt, dem sog. Selektionsmarker, einen Wachstumsvorteil verschaffen.
- 5
- Amphibienzelle, Zelle aus einem Tier der Klasse der Amphibia
 - Bakterienzelle, Zelle die dem Überreich der Eubacteria oder Archaeobacteria zuzuordnen ist, oder von ihr abstammt.
- 10
- Hefezelle, Zelle die der Ordnung der Endomycetalse zuzuordnen ist, oder von ihr abstammt.
 - Insektenzelle, Zelle die der Ordnung der Hexapoda zuzuordnen ist, oder von ihr abstammt.
- 15
- native Säugetierzelle, aus einem Säugetier stammende Zelle, die in ihren relevanten Merkmalen der im Organismus befindlichen Zelle entspricht.
- 20
- immortalisierte Säugetierzelle: Zelle die durch die angewendeten Kulturbedingungen oder gentechnische Manipulation die Eigenschaft erlangt hat, sich über die normalerweise übliche Teilungshäufigkeit hinaus (ca.100) in der Kultur zu teilen.
- 25
- markiert: durch entsprechende Modifizierung oder Derivatisierung für eine Nachweisreaktion zugänglich gemacht. Beispielsweise radioaktiv, fluoreszierend oder lumineszierend.
- 30
- Ligand: Substanz, die an ein im Körper oder einer Zelle befindliches Molekül, im speziellen einen Rezeptor, bindet

- Verdrängung: vollständiges oder partielles Entfernen eines Liganden von seiner Bindungsstelle
- 5 - gebundene Aktivität: Biochemisch oder physikalisch erfaßter Meßwert, der mit der an einem Rezeptor gebundenen Ligandenmenge korreliert
- Regulation: die als Teil eines Regelprozesse erfolgte Hemmung oder Aktivierung eines Vorgangs
- 10 - Hemmung: als Sonderfall der Regulation die Verhinderung/Minderung eines Vorgangs
- Aktivierung: als Sonderfall der Regulation die Verstärkung eines Vorgangs
- 15 - Rezeptoren. Im weitesten Sinne alle im pro- oder eukaryoten Organismus vorhandenen Moleküle, an die ein Wirkstoff binden kann. Im engeren Sinne membrangebundene Proteine oder Komplexe mehrerer Proteine, die durch Bindung eines Wirkstoffes eine Änderung in der Zelle hervorrufen.
- 20 - Ionenkanäle: Membrangebundene Proteine oder Komplexe mehrerer Proteine, durch die Kationen oder Anionen durch die Membran hindurchgelangen können.
- 25 - Enzyme: Bezeichnung für Proteine oder Komplexe aus einer aktivierenden Nichteiweißkomponente mit einem Protein, die katalytische Eigenschaften besitzen.
- 30 - Genexpression (exprimieren/exprimierbar): das Übersetzen der genetischen Information eines Genes in RNA (RNA-Expression) oder in Protein (Proteinexpression).

- Ionenmilieu: Ionenkonzentration eines oder mehrerer Ionen in einem bestimmten Kompartiment.
- 5 - Membranpotential: Spannungsdifferenz über eine Membran aufgrund eines Überschusses an Kationen auf der einen Seite und Anionen auf der anderen Seite der Membran.
- 10 - Veränderung der Enzymaktivität: Hemmung oder Induktion der katalytischen Aktivität eines Enzyms.
- 2nd messenger: kleines Molekül, das als Antwort auf ein extrazelluläres Signal entweder im Cytosol gebildet wird oder in das Cytosol hineinwandert und dabei hilft die Information an das Zellinnere weiterzugeben, wie zum Beispiel cAMP, IP₃.
- 15
- (Gen-)Sonde: Bezeichnung für jede Art von Nukleinsäuren, mit deren Hilfe man ein gesuchtes Gen oder eine bestimmte DNA-Sequenz nachweisen kann. Durch Derivatisierung der Gensonde (z.B. Biotin, magnetische Beads, Digoxinin) können zudem DNA-Moleküle aus einem Gemisch herausgezogen werden. Als Sonden werden klonierte Gene, Genfragmente, chemisch synthetisierte Oligonukleotide und auch RNA verwendet, die meist radioaktiv markiert ist.
- 20
- 25 - DNA: Internationale Bezeichnung für Desoxyribonukleinsäure
- genomische DNA: Generelle Bezeichnung für die bei eukaryontischen Organismen aus dem Zellkern einer Zelle stammenden DNA.
- 30 - cDNA: Abkürzung für complementary DNA. Bezeichnung für die einzel- bzw. doppelsträngige DNA-Kopie eines RNA-Moleküls.

- cDNA-Bank/Bibliothek: Bezeichnung für eine Sammlung von willkürlich klonierten cDNA-Fragmenten, die zusammengekommen die Gesamtheit aller von einer Zelle oder einem Gewebe synthetisierten RNA repäsentieren.

5

- cDNA-Klon: Bezeichnung für eine Population genetisch einheitlicher Zellen, die sich von einer einzigen Zelle ableiten, derart, daß diese Zelle eine künstlich eingebrachtes cDNA-Fragment enthält.

10

- Hybridisierung: Durch Basenpaarung bewirkte Ausbildung eines doppelsträngigen Nukleinsäuremoleküls aus zwei getrennten Einzelsträngen.

15

- stringente Bedingungen: Bedingungen, unter denen nur perfekt basengepaarte Nukleinsäure-Stränge gebildet werden und stabil bleiben.

20

- isolieren: ein gesuchtes Molekül aus einem Gemisch herausfinden und abtrennen.

25

- DNA-Sequenzierung: Bestimmung der Abfolge der von Basen in einem DNA-Molekül.

- Nukleinsäuresequenz: Bezeichnung für die Primärstruktur eines DNA-Moleküls, d.h. die Abfolge der einzelnen Basen, aus denen sich eine DNA zusammensetzt.

30

- Genspezifische Oligonukleotid Primer: Oligonukleinsäuren, also 10-40 Basen lange Nukleinsäurefragmente, die in ihrer Basenzusammensetzung eine stringente Hybridisierung an das gesuchte Gen oder die gesuchte cDNA erlauben.

- Ermitteln von Oligonukleotid Primern: Die manuelle oder Computerunterstützte Suche von Oligonukleotiden zu einer vorgegebenen DNA-Sequenz, die für eine Hybridisierung und/oder eine Polymerase-Ketten Reaktion optimal geeignet sind.
- PCR: Abkürzung für Polymerase-Kettenreaktion. In vitro-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nucleinsäure-Bereichen definierter Länge und definierter Sequenz aus einem Gemisch von Nukleinsäure-Molekülen.
- DNA-Template: Nukleinsäuremolekül oder ein Gemisch von Nukleinsäuremolekülen, aus denen ein DNA-Abschnitt mit Hilfe der PCR (s.o.) vervielfältigt wird.
- RNA: International gebräuchliche Abkürzung für Ribonukleinsäuren
- mRNA: International gebräuchliche Abkürzung für messenger-Ribonukleinsäuren, die am Transfer der genetischen Information aus dem Kern in die Zelle beteiligt sind und die Information für die Synthese eines Polypeptids oder eines Proteins beinhalten.
- Antisense Polynukleotid: Eine aus mehreren natürlichen oder modifizierten Nukleinsäuren bestehendes Molekül, deren Basenabfolge komplementär zur Basenabfolge eines Teilbereiches einer in der Natur vorkommenden RNA ist.
- PNA: International gebräuchliche Abkürzung für peptidic Nucleic Acids. Hierbei bilden peptidisch verknüpfte Aminosäuren eine Kette, wobei die Aminosäuren als Seitenkette eine für die Hybridisierung mit DNA oder RNA fähigen Base trägt.

- Sequenz: Abfolge von Nukleotiden oder Aminosäuren. Im spezifischen Sinne dieser Erfindung ist damit die Nukleinsäuresequenz gemeint.
- 5 - Ribozym: Bezeichnung für eine katalytisch aktive Ribonukleinsäure (z.B. Ligase, Endonuklease, Polymerase, Exonuklease)
- DNA-Enzym: Bezeichnung für ein DNA-Molekül, das katalytische Aktivität beinhaltet (z.B. Ligase, Endonuklease, Polymerase, Exonuklease)
- 10 - katalytische RNA/DNA: generelle Bezeichnung für Ribozyme bzw. DNA-Enzyme (s.o.).
- Adenovirus: bei Vertebraten vorkommender cytopathogener Virus
- 15 - Adenoassoziiertes Virus (AAV): Gehört zur Familie der Parvoviren. Für eine effektive Vermehrung des AAV ist eine Coinfektion der Wirtszellen mit Helferviren (z.B. Herpes-, Vaccina- oder Adenoviren) erforderlich. Die Eigenschaft von AAV, stabil in das Wirtsgenom zu integrieren,
- 20 macht es als Transduktionsvektor für Säugetierzellen besonders interessant.
- Herpesvirus: Viraler Erreger der Herpes-Infektion
- 25 - posttranslationale Modifikation: Veränderung an Proteinen oder Polypeptiden, die nach der Translation durchgeführt wird, hierzu zählen z.B. Phosphorylierung, Glykosylierung, Amidierung, Acetylierung oder Proteolyse.
- 30 - glykosilieren: Bezeichnung für das Anhängen von einzelnen Zuckermolekülen oder ganzen Zuckerketten an Proteine.

- phosphorylieren: Bezeichnung für das Anhängen von einem oder mehreren Phosphatresten an ein Protein, bevorzugt an die OH-Gruppen der Aminosäuren Serin, Threonin oder Tyrosin.
- 5 - amidieren: Die Bezeichnung für das Umwandeln einer Carboxylfunktion in eine Amidfunktion, z.B. an den carboxyterminalen Aminosäurerest eines Peptides oder Proteins.
- 10 - mit Membrananker versehen: Posttranslationelle Modifikation eines Proteins, oder eines anderen organischen Moleküls, derart daß es durch Anhängen eines hydrophoben Moleküls, geeigneterweise eine Fettsäure oder ein Derivat derselben, an die Lipiddoppelschicht-Membran von Zellen verankert wird.
- 15 - spalten: in diesem spezifischen Fall die Spaltung eines Peptids oder Proteins in mehrere Untersequenzen.
- 20 - verkürzen: Ein aus mehreren Einzelteilen bestehendes Molekül um eine oder mehrere Teile zu verkürzen.
- 25 - Antikörper: Lösliche, oder an Zellmembranen gebundene, als Immunglobuline bezeichnete Proteine mit einer spezifischen Bindungsstelle für Antigene.
- monoklonaler Antikörper: sind gegen eine einzige antigene Determinante eines Antigens gerichtete Antikörper mit extrem hoher Selektivität
- 30 - polyklonaler Antikörper: Gemisch aus Antikörpern, die gegen mehrere Determinanten eines Antigens gerichtet sind.

- transgen: genetisch verändert
- nichthumanes Säugetier: Die Gesamtheit der Säugetiere (Klasse der Mammalia) mit Ausnahme der Spezies Mensch.
- 5
- Keim-Zelle: Zelle mit haploidem Genom, die durch Verschmelzung mit einer zweiten Keimzelle die Bildung eines neuen Organismus ermöglicht.
- 10
- somatische Zelle: diploide Zelle als Bestandteil eines Organismus
- chromosomale Einbringung: Eingriff in die Nukleotidsequenz auf chromosomaler Ebene
- 15
- Genom: Allgemeine Beschreibung für die Gesamtheit aller Gene in einem Organismus
- Vorfahr des Tieres: Ein Tier (der Vorfahr), das auf natürliche oder künstliche Weise durch Weitergabe an seinem genetischen Material in direkter Linie mit einem anderen Tier (dem Nachfahren) verwandt ist.
- 20
- exprimierbar: Ein Nukleinsäuremolekül ist dann exprimierbar, wenn es die Information zur Synthese eines Proteins oder Polypeptids beinhaltet und mit entsprechenden regulatorischen Sequenzen versehen ist, die eine Synthese dieses Proteins oder Polypeptids in vitro oder in vivo erlauben. Wenn diese Voraussetzungen nicht mehr gegeben sind, beispielsweise durch Eingriff in die kodierende Sequenz, ist das Nukleinsäuremolekül nicht mehr exprimierbar.
- 25
- Nagetier: Tier aus der Ordnung der Rodentia, z.B. Ratte oder Maus
- 30

- als schmerzregulierende Substanz identifizierbar: Substanz die bei Einbringung in einen lebenden Organismus eine Verhaltensänderung bewirkt, die der Fachmann als schmerzhemmend bezeichnet (antinozizeptiv, antihyperalgetisch oder antiallodynisch). Im Falle des Screeningverfahrens bezieht sich das darauf, daß die Substanz beim Screening durch stärkere Bindung oder Auslösung einer Änderung eines funktionellen Parameters deutlich, beispielsweise 100 %, die Bindung oder Wechselwirkung des Durchschnitts der getesteten Substanzen übertrifft.
- Verbindung: ein anderer Name für Molekül, als aus mehreren Atomen bestehend, hier ein durch das erfindungsgemäße Verfahren identifiziertes Molekül.
- Wirkstoff: Eine Verbindung, die bei Anwendung an einem Organismus eine Veränderung in diesem Organismus hervorruft. Im Besonderen werden darunter organisch-chemisch synthetisierte Moleküle verstanden, die auf den Organismus eine heilende Wirkung ausüben. Hier insbesondere Moleküle, die an die erfindungsgemäßen Proteine und Peptide binden.
- niedermolekular: Molekül mit einem Molekulargewicht < 2kDa
- Arzneimittel: ein Stoff entsprechend der Definition im Artikel 1 §2 des Gesetzes über den Verkehr mit Arzneimitteln
- Diagnostikum: Verbindung oder Verfahren, das verwendet werden kann, um eine Krankheit zu diagnostizieren
- Behandlung von Schmerz: Verfahren, mit dem Ziel Schmerzen zu lindern oder aufzuheben, oder das zu erwartende Auftreten von Schmerzen zu hemmen (preemptive Analgesie).

5

- chronischer Schmerz: eine Schmerzempfindung von länger anhaltender Dauer, oft dadurch gekennzeichnet, daß sie über Zeitpunkt und Ort des initialen Stimulus hinausreicht, die Schmerzempfindlichkeit des Körpers steigert.

10

- Gentherapie: Unter Gentherapie versteht man alle Verfahren, die das Ziel haben, genetische Erkrankungen durch geeignete Veränderungen des Genoms kausal zu behandeln.

15

- In-vivo-Gentherapie: Einbringen von genetischem Material in den lebenden Organismus mit dem Ziel der Gentherapie. Man kann zwischen somatischem und Keimbahn-Eingriff unterscheiden, der einmal an diploiden Zellen und einmal an haploiden Zellen stattfindet.

20

- In-vitro-Gentherapie: Einbringen von genetischem Material in Zellen außerhalb des menschlichen Körpers mit dem Ziel diese nachher wieder durch Einbringen in den menschlichen Körper zur Gentherapie zu verwenden.

25

- Diagnostik: Verfahren, um eine Krankheit zu identifizieren.
- Wirksamkeitsuntersuchung: Untersuchung mit dem Ziel die Wirksamkeit einer Verbindung nach Einwirkung auf einen lebenden Organismus zu untersuchen.

30

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens wird die Zelle vor dem Schritt (a) gentechnisch manipuliert. Dabei wird genetisches Material in die Zelle eingebracht, insbesondere eine oder mehrere Polynukleotidsequenzen. In einer weiter bevorzugten Variante dieser Ausführungsform erlaubt die gentechnische Manipulation die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen

Parameter. In dieser Ausführungsform werden durch gentechnische Manipulation Voraussetzungen geschaffen unter denen die Veränderung eines funktionellen Parameters überhaupt oder verbessert gemessen werden kann. Dabei ist es insbesondere bevorzugt, daß durch die gentechnische Manipulation eine in der Zelle nicht endogen exprimierte Form eines G-Proteins exprimiert oder ein Reportergen eingeführt wird. Darunter ist insbesondere die gentechnische Einführung eines endogen nicht vorhandenen oder physiologisch nicht exprimierten G-Proteins (GTP-bindenden Proteins) in die Zelle zu verstehen, beispielsweise die Einführung eines chimären G-Proteins, das eine Veränderung des Signalweges erlaubt oder eines promiskuitiven G-Proteins, das sehr bindungsfreudig ist. Die Einführung eines Reportergens wiederum erlaubt die Messung einer (extrazellulär ausgelösten) induzierten Expression des Genproduktes.

15

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform wird die Zelle gentechnisch so manipuliert, daß die Zelle mindestens ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid enthält. Damit kann beispielsweise erreicht werden, daß ein Teilprotein oder Protein, das in der im Verfahren verwendeten Zelle oder Präparation nicht endogen exprimiert wird, von der Zelle synthetisiert wird. Dabei ist es insbesondere bevorzugt, wenn das Polynukleotid in einem rekombinanten DNA-Konstrukt enthalten ist. Unter einem (rekombinanten) DNA-Konstrukt versteht man ein in-vitro hergestelltes DNA-Molekül.

20

25

Wenn beim Verfahren vor dem Schritt a) die Zelle gentechnisch manipuliert wird, ist es bevorzugt, daß die Zelle nach der gentechnischen Manipulation und vor dem Schritt (a) unter Bedingungen, die eine Expression erlauben, kultiviert wird, gegebenenfalls unter Selektionsdruck. Unter kultivieren versteht man, Zellen oder Gewebe bei Bedingungen, die ein Überleben der Zellen, bzw. deren Nachfolgeneration sichern, zu halten. Dabei sollten

30

die Bedingungen hier so gewählt werden, daß eine Expression des durch die gentechnische Manipulation eingefügten Materials ermöglicht wird. Dazu sollten pH, Sauerstoffgehalt, und Temperatur physiologisch gehalten sein und ausreichend Nährstoffe und notwendige Cofaktoren beigelegt sein.

5 Der Selektionsdruck erlaubt, nur die Zellen weiter zu kultivieren, bei denen die gentechnische Manipulation zumindest teilweise erfolgreich war. Dazu gehört beispielsweise die Einführung einer Antibiotikaresistenz über das DNA-Konstrukt.

10 Es ist bei dem erfindungsgemäßen Verfahren besonders bevorzugt, wenn die verwendete Zelle eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle ist. Beispiele für Amphibienzellen sind *Xenopus* Oocyten, für Bakterienzellen *E. coli*-Zellen, für Hefezellen solche auch *Saccharomyces cerevisiae*, für
15 Insektenzellen Sf9-Zellen, für immortalisierte Säugetierzelle HeLa-Zellen und für native Säugetierzellen die CHO (Chinese Hamster Ovary)-Zelle.

Bei einer bevorzugten Meßmethode zur Feststellung der Bindung der Substanz an Teilprotein oder Protein im erfindungsgemäßen Verfahren
20 erfolgt die Messung der Bindung über die Verdrängung eines bekannten markierten Liganden vom Teilprotein oder Protein und/oder über die daran gebundene Aktivität einer markierten Testsubstanz. Dabei ist ein Ligand ein mit hoher Spezifität an das Protein oder Teilprotein bindendes Molekül, das durch eine ebenfalls bindende, zu testende Substanz aus der
25 Bindungsstelle verdrängt wird. Unter Markierung ist eine den Nachweis erleichternde künstliche Modifikation am Molekül zu verstehen. Beispiele sind radioaktive, fluoreszierende oder lumineszierende Markierung.

Bei einer anderen bevorzugten Meßmethode zur Feststellung der durch die
30 Bindung der Substanz an Teilprotein oder Protein im erfindungsgemäßen Verfahren ausgelösten Veränderung der funktionellen Parameter, erfolgt die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten

funktionellen Parameter über Messung der Regulation, Hemmung und/oder Aktivierung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen, insbesondere über Messung der Veränderung der Genexpression, des Ionenmilieus, des pH oder des Membranpotentials, über Veränderung der Enzymaktivität oder der Konzentration der 2nd messenger. Damit ist auf der einen Seite direkt die Messung der Wirkung der Substanz über die Beeinflussung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen erfaßt, auf der anderen Seite als bevorzugt zu messende Beispiele sich ändernder Parameter wie Genexpression, Ionenmilieu, pH, Membranpotential, Enzymaktivität oder Konzentration der 2nd messenger. Dabei versteht man unter Ionenmilieu insbesondere die Konzentration eines oder mehrerer Ionen in einem Zellkompartiment, insbesondere dem Cytosol, unter Membranpotential die Ladungsdifferenz zwischen zwei Seiten einer Biomembran und unter 2nd messenger Botenstoffe des intrazellulären Signalwegs wie z.B. zyklisches AMP (cAMP), Inositoltriphosphat (IP3) oder Diacylglycerol (DAG).

In diesem Verfahren erfaßt ist die Verwendung von Teilproteinen und insbesondere Proteinen mit bekannter Sequenz und Funktion, ohne daß für diese im Stand der Technik eine Funktion im Schmerz bekannt war.

Weiter bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes Verfahren worin der durch die aufzufindende Substanz regulierte Schmerz ausgewählt ist aus:

chronischem Schmerz, insbesondere muskuloskelettalem Schmerz; neuropathischem Schmerz, insbesondere allodynischem Schmerz, mechanischer Hyperalgesie oder diabetischer Neuropathie; viszeralem Schmerz, cerebralem Schmerz, peripherem Schmerz oder entzündungsbedingtem Schmerz, insbesondere peripherem Entzündungsschmerz; sowie Migräne, Cluster-Kopfschmerz oder den Schmerz bei Trigeminus Neuralgie.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Verbindung identifizierbar als schmerzregulierende Substanz durch ein erfindungsgemäßes Verfahren. Hierbei bezieht sich Verbindung insbesondere auf
 5 niedermolekulare Wirkstoffe, aber auch auf Peptide, Proteine und Nukleinsäuren. Dabei bedeutet identifizierbar, daß die Verbindung das Merkmal aufweist, daß es beim erfindungsgemäßen Screeningverfahren bezüglich der Bindung deutlich stärker, vorzugsweise doppelt so stark bindet wie der Durchschnitt der zu testenden Substanzen oder bezüglich
 10 der Änderung der funktionellen Parameter deutlich vom Durchschnitt der zu testenden Substanzen abweicht. Besonders bevorzugt ist es, wenn die erfindungsgemäße Verbindung eine niedermolekulare Verbindung ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung

- 15
- a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
 - 20 b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
 - 25 c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus
 - 30

oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,

- 5 d. von BNPI oder DNPI und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnlichen Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder dessen Antisense Polynukleotide bindet oder eines mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine, wobei das Protein oder Teilprotein gegebenenfalls posttranslational modifiziert, insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde,
- 10 e. eines Antikörpers, vorzugsweise eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers, gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- 15 f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- 20 g. einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13 und/oder
- 25
- 30

- h. eines Wirkstoffs, vorzugsweise eines niedermolekularen Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,

5 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Schmerz.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung zur Behandlung des chronischen, insbesondere neuropathischen oder entzündungsbedingten Schmerzes.

10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung

- a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,

- f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b) oder einen Vektor gemäß Punkt c)

5

zur Herstellung eines Arzneimittels zum Einsatz in der Gentherapie. Dabei ist es besonders bevorzugt, wenn es sich um In-vivo oder In-vitro Gentherapie handelt. Unter Gentherapie versteht man eine Therapieform, bei der durch die Einführung von Nukleinsäuren in Zellen ein Effektorgen, meist ein Protein, exprimiert wird. Man unterscheidet prinzipiell In-vivo- und In-vitro-Verfahren. In In-vitro-Verfahren werden Zellen aus dem Organismus entfernt und ex-vivo mit Vektoren transfiziert, um anschließend wieder in denselben oder in einen anderen Organismus eingebracht zu werden. Bei der In-vivo-Gentherapie werden Vektoren, beispielsweise zur Bekämpfung von Tumoren, systemisch (z.B. über die Blutbahn) oder direkt in das Zielgewebe (z.B. in einen Tumor) appliziert. Bevorzugt ist es weiter, wenn es sich weiter um ein Arzneimittel zur Behandlung von Schmerz handelt.

10

15

20

Bevorzugt beim Einsatz in der Gentherapie ist auch die Verwendung eines Polynukleotids, beim dem es sich um ein Antisense Polynukleotid oder PNA handelt, oder das Teil eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA ist.

25

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung

- a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten

30

Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,

- 5 b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- 10 c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,
- 15 d. von BNPI oder DNPI und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnlichen Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder dessen Antisense Polynukleotide bindet oder eines mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine, wobei das Protein oder Teilprotein gegebenenfalls posttranslational modifiziert, insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert,
- 20
- 25
- 30

- methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde,
- e. eines Antikörpers, vorzugsweise eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers, gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
 - f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e),
 - g. einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13 und/oder
 - h. eines Wirkstoffs, vorzugsweise eines niedermolekularen Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,

zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose eines Schmerzzustandes. Dabei versteht man unter Diagnostik die Analyse von einem Krankheitsbild zugeordneten Symptomen und unter Wirksamkeitsuntersuchungen Untersuchungen über die Wirksamkeit zu testender Substanzen, insbesondere ihrer medizinischen Wirksamkeit.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Peptids oder Proteins, bei dem eine erfindungsgemäße Zelle, die ein erfindungsgemäßes Polynukleotid und/oder einen erfindungsgemäßen Vektor enthält, kultiviert und gegebenenfalls das Peptid oder Protein isoliert wird.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung

- 5 a. eines Polynukleotids , vorzugsweise einer DNA oder RNA, kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- 10 b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- 15 c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,
- 20 d. von BNPI oder DNPI und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnlichen Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines

25 Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder dessen Antisense Polynukleotide bindet oder eines mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen

30 Teilproteins eines der vorgenannten Proteine, wobei das Protein oder Teilprotein gegebenenfalls posttranslational modifiziert, insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert,

acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde,

- e. eines Antikörpers, vorzugsweise eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers, gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)

in einem Verfahren zur Auffindung schmerzregulierender Substanzen.

Generell ist es bei allen vorgenannten erfindungsgemäßen Verwendungen bevorzugt, wenn der Schmerz ausgewählt ist aus

chronischem Schmerz, insbesondere muskuloskelettalem Schmerz; neuropathischem Schmerz, insbesondere allodynischem Schmerz, mechanischer Hyperalgesie oder diabetischer Neuropathie; viszeralem Schmerz, cerebralem Schmerz, peripherem Schmerz oder entzündungsbedingtem Schmerz, insbesondere peripherem Entzündungsschmerz; sowie Migräne, Cluster-Kopfschmerz oder dem Schmerz bei Trigemini Neuralgie.

Mit den erfindungsgemäß verwendeten Polynukleotid sind auch die dargestellten Genfragmente selbst umfaßt, wie auch ein Polynukleotid, das entweder vollständig oder zumindest Teilen der kodierenden Sequenz des dem Fragment entsprechenden Gens entspricht. Damit sind auch Polynukleotide gemeint, die mindestens 90%-ige, vorzugsweise 95%-ige, insbesondere wenigstens 97%-ige Übereinstimmung in der Basenabfolge

mit der kodierenden Sequenz der abgebildeten Polynukleotide oder der kodierenden Sequenz der Gens aufweisen. Es ist weiter bevorzugt, daß es sich bei dem Polynukleotid um RNA bzw. ein- oder doppelstängige DNA, insbesondere mRNA oder cDNA handelt. Ebenso ist es bevorzugt, daß es sich bei dem Polynukleotid um ein Antisense-Polynukleotid oder PNA handelt, das eine Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an ein erfindungsgemäßes Polynukleotid zu binden. Dabei versteht man unter PNA „peptidic nucleic acid“ (peptidische Nukleinsäure), die zwar die Basenpaare trägt, aber dessen Rückgrat peptidisch gebunden ist. Ein Antisense-Polynukleotid zeigt die komplementäre Basenabfolge zu mindestens einem Teil einer Basis-Nukleinsäure. Ebenfalls bevorzugt ist es, daß das Polynukleotid Teil eines Ribozym oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA bzw. DNA ist. Unter Ribozym ist eine katalytisch aktive Ribonukleinsäure zu verstehen, unter DNA-Enzym eine entsprechende Desoxyribonukleinsäure, also katalytische RNA beziehungsweise DNA.

Unter dem erfindungsgemäß verwendeten Vektor versteht man ein Nukleinsäuremolekül, das bei gentechnischer Manipulation dazu dient, Fremdgene zu enthalten bzw. zu übertragen. Besonders bevorzugt ist dabei, daß es sich um einen Expressionsvektor handelt. Er dient damit der Expression des enthaltenen Fremdgens, des Polynukleotids. Weiter bevorzugt ist ein derartiger Vektor, der abgeleitet ist von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder er mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz enthält. Ein LTR ist ein „Long-TerminalRepeat“, ein am Ende befindlicher Abschnitt beispielsweise bei Viren. Poly-A-Sequenz ist ein mehr als 20 Adenosinreste langer Schwanz. Eine Promotorsequenz ist der Steuerungsbereich für die Transkription.

Bevorzugt ist es für ein verwendetes Protein bzw. ein daraus abgeleitetes Teilprotein, wenn diese posttranslational modifiziert wurde, es

insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde. Posttranslationale Modifikationen sind beispielsweise dem Voet/Voet, Biochemistry, 1st Edition, 1990, S. 935-938 zu entnehmen.

5

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn das Polynukleotid (gegebenfalls gemäß Punkt a) und/oder Punkt b)) eine RNA oder eine ein- oder doppelstängige DNA, insbesondere mRNA oder cDNA ist.

10

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn das Polynukleotid (gegebenfalls gemäß Punkt b)) Teil eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA ist.

15

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn der Vektor (gegebenfalls gemäß Punkt c)) ein Expressionsvektor ist.

20

Dabei ist es weiter für eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn der Vektor (gegebenfalls gemäß Punkt c)) abgeleitet ist von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder er mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz enthält.

25

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung (nicht Gentherapie) besonders bevorzugt, wenn das Protein oder Teilprotein (gegebenfalls gemäß Punkt d)) posttranslational modifiziert wurde, es insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde.

30

Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung (nicht Gentherapie) besonders bevorzugt, wenn der Antikörper (gegebenenfalls gemäß Punkt e)) ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper ist.

5 Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn es sich bei der Zelle (gegebenenfalls gemäß Punkt f)) um eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle handelt.

10 Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn es sich bei der Verbindung (gegebenenfalls gemäß Punkt g)) um eine niedermolekulare Verbindung handelt.

15 Dabei ist es für eine erfindungsgemäße Verwendung besonders bevorzugt, wenn der genannte Wirkstoff gemäß Punkt h) ein niedermolekularer Wirkstoff ist.

20 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Schmerzbehandlung, eines nichthumanen Säugetieres oder Menschen, das oder der eine Behandlung von Schmerzen, insbesondere chronischer Schmerzen, benötigt, durch Verabreichung eines erfindungsgemäßen Arzneimittels, insbesondere solche enthaltend eine erfindungsgemäße Substanz und/oder einen an BNPI und/oder DNPI bindenden Wirkstoff.

25 Die Verabreichung kann beispielsweise in Form eines Arzneimittels wie oben beschrieben erfolgen.

30 Insgesamt ist eine wichtige Grundlage der Erfindung die Identifizierung schmerzregulierter Gene und Genfragmente. Darauf basiert das Screeningverfahren. Aber auch die Verwendung zur Diagnose oder Therapie bietet sich wie bereits ausgeführt an. Im folgenden werden

entsprechende Anwendungsmöglichkeiten und weitere Ausführungsbeispiele erläutert.

1. Therapie chronischer Schmerzen

5 Die mRNA-Expression der Kinasen wurde durch in-situ-Hybridisierung im Rückenmarksgewebe untersucht. Im Rückenmark projizieren die primären sensorischen Neurone auf nachgeschaltete zentralnervöse Neurone, es handelt sich hierbei neben supraspinalen Vorgängen um die zentrale Umschaltstelle für nozizeptive Information. Zahlreiche Experimente konnten
10 zeigen, daß der Entwicklung chronischer Schmerzzustände plastische Veränderungen des Nervensystems zugrundeliegen (als Überblick siehe Corderre et al., 1993; Zimmermann und Herdegen, 1996). Insbesondere in den Neuronen der dorsalen Wurzelganglien und des Rückenmarks sind plastische Veränderungen beschrieben worden, die mit der Regulation schmerzrelevanter Gene einhergeht. So ist für eine Reihe von Neurotransmitter-Rezeptoren, die für die Schmerztherapie von Bedeutung sind, eine Gen-Regulation im Rückenmark beschrieben worden (siehe
15 Tabelle 1). Auf dieser Grundlage könnten die gefundenenen, unter Schmerz regulierten cDNA-Sequenzen zur Therapie (Gentherapie, Antisense, Ribozyme) und Diagnose chronischer Schmerzzustände verwendet werden.
20

1.1 Antisense-Strategien

Hierbei werden, abgeleitet von der Nukleinsäuresequenz der vollständigen
25 cDNA oder von Teilbereichen Konstrukte erstellt, die die mRNA oder Proteinkonzentration herabsetzen können. Dies können z.B. antisense-Oligonukleotide (DNA oder RNA) sein, die eventuell unter Verwendung modifizierter Nukleotidbausteine (z.B. O-Allyl-Ribose) eine erhöhte Stabilität gegenüber Nukleasen aufweisen. Zudem ist die Verwendung von
30 Ribozymen denkbar, die als enzymatisch aktive RNA-Moleküle eine spezifische Spaltung der RNA katalysieren. Daneben könnten auch Vektoren eingesetzt werden, die die erfindungsgemäßen Sequenzen oder

Teilbereiche dieser Nukleotidsequenzen unter Kontrolle eines geeigneten Promotors exprimieren und somit für eine in-vivo oder ex-vivo Therapie geeignet sind. Zusätzlich sind auch Antisense-Konstrukte möglich, die unter Austausch des Phosphatrückgrats von Nukleotidsequenzen (z.B. PNAs, d.h. Peptide Nucleic Acids) oder Verwendung nichttraditioneller Basen wie Inosine, Queosine oder Wybutosine sowohl wie Acetyl-, Methyl-, Thio- und ähnlich modifizierte Formen von Adenin, Cytidin, Guanosin u, Thymidin und Uridin nicht oder in geringerem Masse durch endogene Nukleasen abgebaut werden können.

1.2. Antagonisten/ Agonisten bzw. Inhibitoren/Aktivatoren der im Screeningverfahren verwendeten erfindungsgemäßen Genprodukte.

Dies umfaßt Substanzen, die durch eine Bindung an das Genprodukt dessen Funktion verändern. Dies können sein:

1.2.1. Organisch-chemische Moleküle, die im Rahmen eines Wirkstoffscreenings unter Verwendung der Genprodukte der erfindungsgemäßen cDNA als Bindungspartner gefunden werden.

1.2.2. Antikörper, seien es polyklonale, chimäre, single-chain, F_{ab}-Fragmente oder Fragmente aus Phagen-Banken, die bevorzugt als neutralisierende Antikörper über eine Bindung an die Genprodukte spezifisch die Funktion beeinflussen.

1.2.3. Aptamere, d.h. Nukleinsäuren oder Nukleinsäurederivate mit Proteinbindenden Eigenschaften. Dazu gehören auch sog. Spiegelmere, die durch Spiegelevolution gewonnene spiegelbildliche und damit stabile Oligonukleotide darstellen, die hochaffin und hochspezifisch ein Zielmolekül binden können (Klußmann et al., 1996).

1.3. Gentherapie

Die beschriebenen Sequenzen können zur Therapie neurologischer Erkrankungen insbesondere chronischer Schmerzzustände eingesetzt werden, indem sie nach Klonierung in geeignete Vektoren (z. B. Adenovirus-Vektoren oder adeno-assoziiertes-Virus-Vektoren) zur in vivo

oder ex-vivo Therapie verwendet werden, um dort z.B. einer Überexpression oder Unterexpression des endogenen Genproduktes entgegenzusteuern, die Sequenz des defekten Genproduktes zu korrigieren (z. B. durch Transsplicing mit dem exogenen Konstrukt) oder ein funktionelles Genprodukt zur Verfügung zu stellen.

2. Diagnose

Polynukleotidsequenzen (Oligonukleotide, antisense -DNA & RNA-Moleküle, PNAs), die von den im Screeningverfahren etc. verwendeten Nukleotidsequenzen abgeleitet sind, könnten zur Diagnose von Zuständen oder Erkrankungen eingesetzt werden, die mit einer Expression dieser Gensequenzen assoziiert sind. Beispiele dieser Zustände oder Erkrankungen beinhalten neurologische Erkrankungen inklusive chronischer Schmerzen oder neuropathischer Schmerzen (hervorgerufen z.B. durch Diabetes, Krebs oder AIDS) oder neurodegenerativer Erkrankungen wie Alzheimer, Parkinson, Chorea Huntington, Jacob-Creutzfeld, amyotrophe Lateralsklerose und Demenzen. Die Nukleotidsequenzen könne auf vielfältige Weise (Northernblot, Southernblot, FISH-Analyse, PRINS-Analyse, PCR) entweder zur Identifizierung der Genproduktes oder abweichender diagnostisch relevanter Genprodukte oder zur Quantifizierung des Genproduktes dienen. Neben der Nukleinsäurediagnostik können auch Antikörper oder Aptamere gegen das von den erfindungsgemäßen Nukleinsäuren kodierte Protein zur Diagnostik eingesetzt werden (z. B. mittels ELISA, RIA, immuncytochemische oder immunhistochemische Verfahren), um das Protein oder abweichende Formen zu identifizieren und das Protein zu quantifizieren.

Im Hinblick auf eine Gendiagnostik könnten Nukleinsäure-Sonden abgeleitet von den erfindungsgemäßen Nukleotidsequenzen zur

Bestimmung des Gen-Lokus eingesetzt werden (z.B. durch FISH, FACS, artifizielle Chromosomen wie YACs, BACs oder P1-Konstrukte).

5

Die folgenden Beispiele und Abbildungen sollen die Erfindung erläutern, ohne sie darauf zu beschränken.

10

Abbildungen und Beispiele

Abbildungen:

- Fig. 1a) cDNA-Sequenz von BNPI, human; AN: NM_020309
- Fig. 1b) Aminosäure-Sequenz von PIM1-Kinase, human; AN: NM_020309
- 20 Fig. 1c) cDNA-Sequenz von BNPI, human; Nr.: AAT42064 aus WO96/34288
- Fig. 1d) Aminosäure-Sequenz von BNPI, human; Nr.: AAT42064 aus WO96/34288
- Fig. 1e) cDNA-Sequenz von BNPI, Ratte; AN: U07609
- Fig. 1f) Aminosäure-Sequenz von BNPI, Ratte; AN: U07609
- Fig. 2a) cDNA-Sequenz von DNPI, human; AN: AB032435
- Fig. 2b) Aminosäure-Sequenz von DNPI, human; AN: AB032435
- Fig. 2c) cDNA-Sequenz von DNPI, Ratte; AN: AF271235
- Fig. 2d) Aminosäure-Sequenz von DNPI, Ratte; AN: AF271235
- 30 Fig. 3) Auftrennung von radioaktiv-markierten RFDD-PCR-Fragmenten in einem 6%-igen denaturierenden PAA-Gel (s. Beispiel 1)
- Fig. 4) Hochregulation der DNPI- und BNPI-Proteinexpression in primären sensorischen Ratten-DRG-Neuronen und Fasern nach Collageninduzierter Arthritis. (s. Beispiel 2)
- 35 Fig. 5) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Synapsen der Schmerzleitung und motorischen Arealen des lumbaren Rückenmarks der Ratte (s. Beispiel 3a)
- Fig. 6) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Synapsen der Dorsalhorn-Schmerzleitung-Arealen des lumbaren Rückenmarks der Ratte (s. Beispiel 3b)
- 40

- Fig. 7) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Synapsen der Schmerzleitung des sakralen Rückenmarks der Ratte (s. Beispiel 3c)
- Fig. 8) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in Synapsen der medullo-cervicospinalen Schmerzleitung des Trigeminalnervs der Ratte (s. Beispiel 3d)
- Fig. 9) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in schmerzrelevanten Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 3e)
- Fig. 10) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in schmerzrelevanten Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 3f)
- Fig. 11) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in schmerzrelevanten Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 3g)
- Fig. 12) Differentielle Expression von DNPI und BNPI in schmerzrelevanten Hinregionen der Ratte (s. Beispiel 3h)

Beispiele:

Beispiel 1: Identifizierung schmerzregulierter Gene mittels RFDD-PCR

A) Vorgehen

Es wurde folgendes Vorgehen gewählt:

Als Ausgangspunkt für die Isolierung schmerzregulierter Gene wurde die CFA-induzierte Arthritis an der Ratte gewählt, bei der das Complete Freund Adjuvans in die Schwanzwurzel injiziert wird. Das Zielgewebe, in dem die schmerzregulierte Expression der erfindungsgemäßen Gene nachgewiesen wurde, waren die dorsalen Wurzelganglien des fünften Lumbalsegmentes. Zur Isolierung differentiell regulierter Gene stehen vier Methoden zur Verfügung:

- cDNA-RDA (cDNA-representational difference analysis; Hubank & Schatz, 1994)

- DDRT-PCR (Differential Display RT-PCR; Liang & Pardee 1992, Bauer et al., 1994), Hiervon gibt es inzwischen verbesserte Modifikationen, wie die sogenannte "Restriction-fragment-differential-display-PCR" (RFDD-PCR), die durch zusätzliche Restriktionsfragmentierung der cDNA in Verbindung mit einer optimierten PCR-Amplifikation eine reproduzierbarere Reaktion erlaubt und zudem vermehrt Fragmente in der kodierenden Region detektiert (Ivanova et al., 1995).

- Subtraktive Hybridisierung (Watson & Margulies, 1993)

- SAGE (Serial Analysis of Gene expression, Velculescu et al., 1995).

Eine vergleichende Bewertung der genannten Methoden führte zur Auswahl der RFDD-PCR, da diese Methode im Gegensatz zur subtraktiven Hybridisierung und der SAGE in der Lage ist, sowohl hoch- und herunterregulierte Gene als auch seltene Transkripte zu erfassen und darüberhinaus innerhalb kurzer Zeitspannen eine Fülle von Ergebnissen liefert.

B) MATERIAL UND METHODEN

Isolierung und Charakterisierung schmerzregulierter cDNA-Sequenzen

Tiermodell: CFA-induzierten Polyarthrititis

Die Adjuvans Arthritis (AA) ist eine induzierte Form der (sub)chronischen Arthritis. Sie wird durch Immunisierung von Ratten mit einer Suspension von Mycobakterien in Öl induziert. Bei der dadurch ausgelösten Erkrankung handelt es sich um eine T-Zell-vermittelte Autoimmun-Arthritis, die – da bei der Induktion jedoch kein definiertes Autoantigen eingesetzt wird - einer spontan auftretenden Arthritis im Menschen entspricht. Die AA wird häufig für Untersuchungen immunologischer Aspekte der Rheumatoiden Arthritis genutzt. Darüber hinaus wird das Modell zur Testung antiinflammatorischer und analgetischer Substanzen herangezogen. Die AA ist eine ziemlich aggressive Form der Arthritis. Der Entzündungsprozess der AA ist zwar selbstheilend, dennoch bleiben schwere Gelenkveränderungen bestehen. Die Schwere der Erkrankung kann über das Aufstellen eines Arthritis Indexes quantifiziert werden. Dabei werden alle vier Pfoten auf Rötung, Schwellung und Deformation der Gelenke untersucht. Ferner kann der Krankheitsverlauf über die Bestimmung des Körpergewichts, der Pfotenschwellung mittels Plethysmographie sowie durch histologische Untersuchungen der Gelenke näher charakterisiert werden.

Die Arthritis wird durch intracutane Injektion von CFA (100 µl der 5 mg/ml Stammlösung) in die Schwanzwurzel (dorsal) induziert. Durch tägliche Beobachtung der Tiere auf Beweglichkeit, Hautrötungen, Schwellungen von Tarsal- und Carpalgelenk wird der Schweregrad der Arthritis anhand eines Scoring-Indexes bestimmt. Das Einsetzen sichtbarer Entzündungen von Tarsal- oder Carpalgelenk beginnt etwa an Tag 10 nach Immunisierung. Die Schwere der Erkrankung nimmt über einen Zeitraum von 10-14 Tagen zu, erreicht ein Optimum, das für etwa 6-7 Tage gehalten wird, um dann wieder abzuklingen. Wurden Ratten nur mit IFA immunisiert, wurde keine Arthritis ausgelöst.

Gewebeentnahme. Die Tiere werden dekapitiert, und die dorsalen Wurzelganglien nach Lubalektomie herauspräpariert und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren.

RNA-Isolierung. Aus den Gewebeproben wurde die Gesamt-RNA mit dem Trizol-Kit (Life Technologies) nach Angaben des Herstellers isoliert. Die RNA wurde UV-spektrometrisch quantifiziert (Extinktion bei 260nm) und durch denaturierende Gelelektrophorese in einem Formaldehyd-Agarosegel (Sambrook et al., 1989) auf Integrität überprüft.

DNase-Verdau. Vor Einsatz in die DDRT-PCR werden eventuelle Spuren an genomischer DNA durch DNase-Verdau entfernt. Hierbei wurden je 6µg RNA in einem Gesamtvolumen von 100µl in 1X First-Strandbuffer (Life Techn.) und 10 Units RNase-freie DNaseI (Boehringer Mannheim) für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach Phenol-Chloroform-Extraktion wurde die RNA durch Zugabe an 1/10 Vol. Natriumacetat pH5.2 und 2.5 Vol. Ethanol präzipitiert, in DEPC-Wasser gelöst, UV-spektrometrisch quantifiziert und durch erneute Formaldehyd-Agarose-Gelelektrophorese charakterisiert.

Reverse Transkription. Je 1 µg DNaseI-verdaute RNA wurden mit Hilfe des displayProfile-Kits (Firma Display Systems Biotech, Vista, USA) nach Angaben des Herstellers revers transkribiert und Doppel-Strang cDNA erzeugt. Nach Aufreinigung der cDNA durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Ethanol-Präzipitation wurde die Effizienz der cDNA-Synthese durch Gelelektrophorese in einem 1.5%igen Agarosegel nachgewiesen.

Taq1-Restriktionsverdau. Je 10 µl der doppelsträngigen cDNA wurden mit dem Restriktionsenzym Taq1 verdaut. Dies wurde ebenfalls mit Hilfe des displayProfile-Kits (Firma Display Systems Biotech, Vista, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Ausgehend von diesem Ansatz werden Adaptoren an die verdaute cDNA ligiert.

³³P-Endmarkierungsreaktion. Zur nachfolgenden Detektion der Fragmente wurde einer der beiden Primer (sog. O-Extension Primer) durch eine Endmarkierungsreaktion mit der T4 Polynukleotidkinase und [$\gamma^{33}\text{P}$]ATP

radioaktiv markiert. Dies wurde ebenfalls mit Hilfe des displayProfile-Kits (Firma Display Systems Biotech, Vista, USA) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

5 **PCR-Amplifikation der cDNAs.** Nach Liagation werden in parallelen Reaktionsansätzen je 0.2µl der cDNA mit dem markierten o-Extension-Primer und einem der 64 Eu-Primer amplifiziert und adie Reaktionsansätze in einem 6% igen Tris-Taurin-EDTA-Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend für eine Stunde bei 80°C
10 getrocknet und über Nacht auf einem BASIII-Detektionsscreen (Fa. Fuji) exponiert. Zur Auswertung wurde der STORM-Phosphor-Imager (Fa. Molecular Dynamics) unter Verwendung der ImageQuant-Software verwendet. Die Autoradiographie-Daten wurden im gleichen
15 Größenmaßstab auf Folie gedruckt, die dann zum Ausschneiden der Fragmente verwendet wurde.

20 **Reamplifikation der DDRT-PCR-Fragmente.** Differentiell regulierte PCR-Banden wurden mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und durch 15minütiges Kochen in 50 µl Tris-EDTA-Puffer aus dem Gelstück eluiert mit Hilfe des displayProfile-Kits (Firma Display Systems Biotech, Vista, USA) nach Angaben des Herstellers durch PCR reamplifiziert. Das
25 Temperaturprofil entsprach der originalen PCR-Reaktion (s.o.). Die PCR-Ansätze anschließend mit 10µl Probenpuffer (0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylenecyanol FF, 30 % Glycerin) versetzt und in einem 3%igen TAE-Agarosegel mit 10µg/ml Ethidiumbromid gelelektrophoretisch aufgetrennt und PCR-Produkte der erwarteten Größe aus dem Gel ausgeschnitten.

30 **Klonierung in TA-Klonierungsvektoren.** Die ausgeschnittenen Fragmente wurden mit dem Qiaquick-Gel-Extraktionskit (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt, bis zur Trockne eingeengt und in 5µl bidest. Wasser aufgenommen. Anschließend wurden sie in den pCRII-

TOPO-Vektor mittels des TOPO TA Cloning Kits (Fa. Invitrogen) nach Angaben des Herstellers ligiert und in TOP10F'-E.coli-Zellen transformiert. Der Transformationsansatz wurde auf LB-Agar-Platten mit 100µg/ml Ampicillin ausgestrichen, die vorher mit 50µl 2% X-Gal (Fa. Sigma) und 50µl Isopropylthiogalactosid (Fa. Sigma) behandelt wurden. Die nach 15 stündiger Inkubation bei 37°C erhaltenen weißen Bakterien-Klone wurden in 5 ml LB-Flüssigmedium mit 100µg/ml Ampicillin (100µg/ml) überführt und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Aus diesen Kulturen wurde Plasmid-DNA unter Verwendung des Qiagen-Spin-Miniprep-Kits (Fa. Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert und je 5µl der Plasmid-DNA durch EcoRI-Restriktionsverdau und anschließende TAE-Agarose-Gelelektrophorese charakterisiert.

Sequenzanalyse. Hierbei wurden je 500 ng der Plasmid-DNA mit dem T7-PCR-Primer unter Verwendung des Dye Terminator Cycle Sequencing Kits (Fa. Perkin-Elmer) nach Angaben des Herstellers sequenziert und die Reaktionen mittels des automatischen Sequencers ABI 370 (Fa. Applied Biosystems Inc.) analysiert. Die DNA-Sequenzen wurden unter Verwendung der bioSCOUT-Software (Fa. LION, Heidelberg) mit den Gendatenbanken abgeglichen.

C) Ergebnis

In Abbildung 3 ist ein entsprechendes Autoradiogramm gezeigt. Das Autoradiogramm zeigt die Auftrennung von PCR-Fragmenten die durch Amplifikation verschiedener cDNAs entstanden sind. Die cDNAs wurden durch reverse Transkription aus Gesamt-RNA aus L5-Spinalganglien synthetisiert. Die Gesamt-RNA wurde aus Kontrolltieren (-) und CFA-behandelten Tieren (+) isoliert. Mit einem Pfeil ist das Fragment ab50-24 gekennzeichnet, das, wie mittels der RFDD-Methode gezeigt, eine Hochregulation aufweist. Das Fragment ab50-24 zeigt eine hochsignifikante Homologie zur cDNA-Sequenz AC-Nr. AAT42064 von hBNPI (s. Abb 1c).

Damit ist nachgewiesen, daß BNPI unter den Bedingungen einer CFA-Behandlung stärker exprimiert wird.

5 **Beispiel 2**
Identifizierung schmerzregulierter Gene über immunzytochemische Färbung

10 Es wurde folgendes Vorgehen gewählt:

15 Als Ausgangspunkt für die Isolierung schmerzregulierter Gene wurde das sogenannte CIA-Model (Collagen-induzierte Arthritis) an der Ratte gewählt, bei dem Colagen injiziert wird, um in der Ratte Arthritis auszulösen.

20 Das Vorgehen entsprach dem bei Persson S., Schäfer MK-H., Nohr D., Ekström G., Post C., Nyberg F. und Weihe E. (1994), Neuroscience 63; 313-326 bzw. Nohr D., Schäfer MK-H., Romeo H., Persson S., Nyberg F. Post C. und Weihe E. (1999), Neuroscience 93; 759-773 beschriebenen Verfahren, wobei die Offenbarung dieser Artikel ausdrücklich zum Teil der hier vorgelegten Offenbarung der Erfindung gemacht wird.

25 Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden polyklonale Kanichen-Antiseren gegen das rekombinante DNPI- bzw. BNPI-Fusionsprotein verwendet. Es zeigte sich in Abbildung 4, daß die Intensität der DNPI- und BNPI-Immunfärbung im lumbaren Dorsal-Root-Ganglion der arthritischen Ratte (B und D/CIA) im Vergleich zu den Kontrolltieren (A und C/CTLR) zunahm. Zu beachten ist die Zunahme sowohl in den Zellkörpern und der Faseranfärbung bei B im Vergleich zu A und bei C im Vergleich zu D.

30

35 **Beispiel 3**
Differentielle Betrachtung der Expression zwischen DNPI und BNPI über immuncytochemische Färbung

Zur immunhistochemischen Anfärbung wurden polyklonale Kanichen-Antiseren gegen das rekombinante DNPI- bzw. BNPI-Fusionsprotein verwendet. Generell wurden Schnitte verschiedener Regionen des ZNS
5 angelegt und die Expression von DNPI mit der von BNPI verglichen.

Beispiel 3a zu Abbildung 5)

Es ist die differentielle Verteilung der Immunreaktivität von BNPI und DNPI
10 im lumbaren Rückenmark der Ratte zu sehen. Die angrenzenden deparafinierten Abschnitte A- bis D sind wie folgt gefärbt:

A = anti-DNPI;
B = anti-DNPI präadsorbiert mit DNPI-Fusionsprotein;
15 C = anti-BNPI;
D = anti-BNPI präadsorbiert mit BNPI-Fusionsprotein;

Die DNPI- (A) und BNPI- (C) Immunfarbstoffe waren voll mit homologem
20 rekombinanten BNPI- (D) und BNPI- (B) Fusionsprotein präadsorbierbar, was die Spezifität der Immunreaktion beweist.

Bemerkenswert ist das gegenseitig ausschließende Verteilungsmuster von DNPI und BNPI-Immunfärbung im äußeren und tiefen Dorsalhorn.
(A;C). Punktierte Immunfärbung von DNPI ist in den synaptischen
25 Endungen des äußeren Dorsalhorns (Lamina 1 und Substantia gelatinosa) (Pfeil in A), während BNPI Immunreaktivität vollständig fehlt (Pfeile in B). Akkumulation von starker positiver ppunktierter BNPI-Immunfärbung liegt im tieferen Dorsalhorn vor, während DNPI-Färbung relativ niedrig ist. DNPI ist präsent in der lateralen spinalen Nukleus (LSN in
30 A), während BNPI völlig fehlt (LSN in C). DNPI ist in der Lamina X um den zentralen Kanal abundant, während BNPI selten ist. BNPI Immunfärbung ist

im lateralen Ventralhorn schwach und gering oder fehlend im medialen Ventralhorn. Durch das ganze Ventralhorn ist punktförmige DNPI-Färbung abundant, etwas weniger im lateralen Horn im Vergleich zum medialen Ventralhorn. Es gibt eine schwache BNPI und DNPI Färbung in einigen Zellkörpern des Ventralhorn Motoneurons, was aber nicht durch die homologen transporter Fusionsproteine präadsorbiert wurde und daher als nichtspezifisch eingestuft wurde.

Beispiel 3b zu Abbildung 6)

10

Es ist die differentielle Verteilung der Immunreaktivität von BNPI und DNPI im linken lateralen oberflächlichen dorsalen lumbaren Rückenmark (left lateral superficial dorsal lumbar spinal cord) der Ratte zu sehen. A und B jeweils für BNPI (A) und DNPI (B) gefärbt zeigen viele punktförmige Anfärbungen für DNPI, die in der Lamina I und substantia gelatinosa konzentriert sind wo BNPI fast vollständig fehlt. Weiter sind dichte Komplexe von DNPI positiven Punkten im lateralen spinalen Nukleus zu sehen, wo BNPI fast vollständig fehlt. Feine DNPI positive Punkte sind auch in den tieferen dorsalen Horn zu finden, wenn auch mit geringerer Dichte.

20

Beispiel 3c zu Abbildung 7)

Es ist die differentielle Verteilung der Immunreaktivität von BNPI und DNPI im sakralen Rückenmark der Ratte zu sehen. Die angrenzenden Abschnitte A und B jeweils für BNPI (A) und DNPI (B) gefärbt zeigen gegenseitige Exclusions-Zonen punktierter DNPI- und BNPI-Immunfärbung im Dorsalhorn. DNPI ist in der gesamten Grey Matter präsent und ist in den sehr äußeren Schichten des Dorsalhorns konzentriert, wo es eine schmale Bande an der Grenze zu White Matter bildet. DNPI ist abundant im lateralen spinalen Nukleus und in der Lamina X wie auch in der Lamina

30

V/VI und im ganzen ventralen Horn. BNPI ist abundant im tiefen Dorsalhorn und selten in Ventralhorn.

Beispiel 3d zu Abbildung 8)

5

Es ist die differentielle Verteilung der Immunreaktivität von BNPI und DNPI in der unteren Medulla oblongata am Übergang zum cervicalen Rückenmark zu sehen. Die angrenzenden Abschnitte A und B jeweils für BNPI (A) und DNPI (B) gefärbt zeigen eine bevorzugte Akkumulation der BNPI-Färbung im medialen Teil des spinalen trigeminalen Nukleus und in dem mittleren und unteren Teil der dorsalen Medulla. es ist nur eine sehr schwache Färbung mit BNPI in den ventralen Medulla zu sehen. DNPI ist abundant in Grey Matter der Medulla. DNPI-Färbung überlappt mit der BNPI-Färbung im inneren spinalen Nucleus V. Es ist zu beachten, daß

10

15 BNPI auch im oberen spinalen trigeminalen Nukleus, der gleich der spinalen substantia gelatinosa ist, zu finden ist. DNPI-Färbung ist in Gebieten schwächer, in denen BNPI präsent ist, schwächer als in Gebieten, wo BNPI niedrig ist oder fehlt. Einige wenige BNPI Punkte sind im ventralen Grey Motor Gebiet zu sehen.

20

Beispiel 3e zu Abbildung 9)

Komplementär differentielle Verteilung von DNPI und BNPI Immunreaktivität in 2 Folgeschnitten des Rattenhirns in schmerzrelevanten

25 Hirnregionen wie sensorischer parietaler Cortex; cingulärer Cortex, Thalamus, Corpus amygdaloideum sowie auch Hypothalamus. DNPI ist im Cortex in den granulären sensorischen Schichten insbesondere in Lamina IV konzentriert; BNPI ist im Cortex abundant aber schwächer in der Lamina IV als in anderen Laminae. Im cingulären Cortex (C vs D als

30 Hochvergrößerung) ist die Verteilung von DNPI und BNPI komplementär wechselseitig excludierend bzw. reziprok in der Dichte der jeweiligen

Synapsen. DNPI überwiegt im Thalamus eindeutig über BNPI, BNPI ist im Hypothalamus spärlich, DNPI abundant. Abundantes BNPI überwiegt im Hypocampus über spärliches DNPI bei wechselseitig komplementärer Verteilung.

- 5 Thalamus = Th,
 Amygdala = Amyg.
 Hippocampus = Hip,
 Cingulärer Cortex = Cg,
 Hypothalamus = Hy,
 10 parietaler Cortex = PC.

Beispiel 3f zu Abbildung 10)

- 15 Komplementär differentielle Verteilung von DNPI und BNPI
 Immunreaktivität in schmerzrelevanten Hirnregionen wie cingulärer Cortex (Cg) und Tectum sowie dorsalem periaquäductalen Grau. DNPI Dominanz im Tectum und dorsalem Grau. Folgeschnitte eines Rattenhirns durch das obere Mesencephalon.

Beispiel 3g zu Abbildung 11)

- 20 Komplementär differentielle Verteilung von DNPI und BNPI Immunreaktivität
 in schmerzrelevanten Hirnregionen wie Tectum (T) sowie periaquäductalen Grau (PAG). DNPI Dominanz im Tectum und dorsalem Grau. Man notiere
 25 differentielle Verteilung von DNPI und BNPI im corpus geniculatum mediale (cgm) der Hörbahn. Folgeschnitte eines Rattenhirns durch das obere Mesencephalon; Ebene colliculus superior.

Beispiel 3h zu Abbildung 12)

Abundanz von DNPI über BNPI in den Habenulae (Hb). DNPI ist präsent im gesamten Habenularkomplex (niedrige Vergrößerung, obere Abbildung; hohe Vergrößerung, mittlere Abb.). BNPI ist nur im medialen Habenularkern (mHb untere Abb., Folgeschnitt zu mittlerer Abbildung).

Analyse zu Beispiel 3 allgemein:

Die differentielle Verteilung von BNPI und DNPI in Synapsen des primärafferenten, spinalen trigeminalen und supraspinalen nociceptiven Systems ist eine starke Evidenz für eine selektive Beeinflussbarkeit nociceptiver Funktionen durch selektive Modulation des DNPI bzw. BNPI-vermittelten Glutamat-Transports. Die Verteilung von BNPI im tiefen Hinterhorn ist eine Indikation für eine präferentielle Rolle des BNPI bei glutamaterg getriebenen neuropathischen Schmerzen.

Die präferentielle Verteilung von DNPI in der lamina 1 und der substantia gelatinosa des spinalen und trigeminalen nociceptiven Systems spricht für eine primäre und präferentielle Rolle von DNPI bei Entzündungsschmerz. Da DNPI-Synapsen auch im tieferen Hinterhorn liegen, ist DNPI auch ein Kandidat bei neuropathischem Schmerz.

BNPI ist ein präferentieller Kandidat für Allodynie und mechanische Hyperalgesie bei Entzündungsschmerz. Glutamat-vermittelter Aß-Input auf spinale nociceptive Projektions-Neurone konvergierend könnte ein wesentlicher Mechanismus für chronischen tiefen muskuloskelettalen Schmerz sein, ein Hauptproblem des chronischen Schmerzes.

Die Präsenz in visceralen sakralen Afferenzen deutet auf Indikation bei viszeralem Schmerz.

Trigeminaler Afferenz: Migräne, Cluster-Kopfschmerz, Trigeminus-Neuralgie.

Beispiel 4:**Durchführung des Screeningverfahrens mit Messung der Bindung über die Verdrängung eines radioaktiv markierten Liganden**

- 5 Ein Nukleinsäureabschnitt, der für BNPI kodiert, wird in einem Expressionsvektor kloniert, der eine konstitutive Expression (z.B. CMV-Promoter) oder eine induzierbare Expression in eukaryonten Zellen erlaubt. Die DNA wird mit geeignetem Transfektionsverfahren, z.B. mit Lipofectamin (Fa. Roche Diagnostics) in eukaryontischen Zellen (z.B. CHO-Zellen, 10 HEK293-Zellen oder NIH-3T3-Zellen) hineingebracht. Die Zellen werden in Anwesenheit eines Selektionsreagenzen (z.B. Zeocin, Hygromycin oder Neomycin) kultiviert so daß nur die Zellen überleben, die das DNA-Konstrukt aufgenommen haben, und bei länger andauernder Selektion, auch in das Genom inkorporiert haben.
- 15 Ausgehend von diesen Zellen werden Membranfraktionen gewonnen, die BNPI in großer Menge enthalten und für einen Bindungsassay verwendet werden können. Dieser besteht aus 1.) dem BNPI enthaltenden Membranen 2.) einem radioaktiv markierten Liganden 3.) einem Bindungspuffer (z.B. 50 mM HEPES pH 7.4, 1 mM EDTA) und dem auf 20 Bindung zu untersuchenden Liganden. Nach Inkubation der oben genannten Reaktionsgemische (für z.B. 30-60 min) bei einer geeigneten Temperatur (meistens Raumtemperatur) werden die nichtgebundenen radioaktiven Ligandenmoleküle abfiltriert. Die Restmenge an gebundenem Liganden wird nach Zugabe eines Szintillationscocktails in einem β -Counter 25 (z.B. Trilux, Fa. Wallac) vermessen. Zeigt die Testsubstanz eine Bindung an BNPI, so wird dies als verringerter radioaktiver Einbau detektiert. Dieses Verfahren wird geeignetermaßen so miniaturisiert, daß es in (96-, 384- oder 1536-well) Mikrotiterplatten durchgeführt werden kann, um dieses Verfahren mittels eines Roboters im sogenannten Highthroughput-Screening 30 (HTS)-Verfahren durchzuführen.

Beispiel 5:**Durchführung des erfindungsgemäßen Screeningverfahrens mit BNPI und Messung der durch die Bindung der Substanz veränderten funktionellen Parameter**

5

10

15

20

25

30

Ein Nukleinsäureabschnitt, der für BNPI kodiert, wird in einem Expressionsvektor kloniert, der eine induzierbare Expression in Prokaryonten, wie z.B. E.coli erlaubt. Hierbei wird der Nukleinsäureabschnitt so modifiziert, daß er als Fusionsprotein mit einer zusätzlichen N- oder C-terminalen Aminosäuresequenz exprimiert wird. Diese Sequenz sollte bei unveränderter Funktion des BNPI eine Aufreinigung über ein spezifisches Verfahren erlauben, z.B. Glutathion S-Transferasefragment, das über Bindung an Glutathion eine Isolierung aus dem Proteingemisch erlaubt. Nach Transfektion der Bakterien, Induktion des Genes (z.B. mit IPTG beim lac-Promoter) und Aufschließen der Bakterien werden die Fusionsproteine aufgereinigt und in einem in vitro-Kinase Experiment eingesetzt. Hierbei werden 5 µg Protein bei 30°C für 30 Minuten in 50 µl Kinasepuffer (20 mM PIPES, pH 7.0, 5 mM MnCl₂, 7 mM β-Mercaptoethanol, 0.4 mM Spermin, 10 mM rATP) ergänzt mit 10 µCi [γ -³²P] ATP. Als Substrate werden gereinigtes Histon H1-Protein (Fa. Sigma) oder bakteriell exprimiertes GST-NFATc1-Fusionsprotein hinzugegeben. Nach der Inkubationszeit wird das nicht-inkorpierte [γ -³²P] ATP abfiltriert und die Menge an eingebautem ³²Phosphat durch β-Szintillation (Trilux, Fa. Wallac) bestimmt. In einem Experiment zum Aufspüren neuer BNPI-Inhibitoren werden in diesem Ansatz die Testsubstanzen mitinkubiert und eine Abnahme der ³²P-Inkorporation als Indikator für einen Inhibitor benutzt. Dieses Verfahren wird geeigneter-maßen so miniaturisiert, daß es in (96-, 384- oder 1536-well) Mikrotiterplatten durchgeführt werden kann, um dieses Verfahren mittels eines Roboters im sogenannten Highthroughput-Screening (HTS)-Verfahren durchzuführen.

Beispiel 6:

Durchführung des erfindungsgemäßen Screeningverfahrens mit DNPI und Messung der durch die Bindung der Substanz veränderten funktionellen Parameter

5

Das Verfahren wird wie in Beispiel 5 beschrieben durchgeführt mit der Ausnahme, daß statt eines Nukleinsäureabschnitt, der für BNPI kodiert, ein Nukleinsäureabschnitt eingesetzt wurde, der für DNPI kodiert.

10

Beispiel 7:

Beispiel für ein Arzneimittel zur Schmerzbehandlung enthaltend eine erfindungsgemäße Verbindung - Tablettenformulierung

15

Tabletten können durch direktes Verpressen von Mischungen der erfindungsgemäßen Verbindung mit entsprechenden Hilfsstoffen oder durch Verpressen von verbindungshaltigen Granulaten (mit gegebenenfalls weiteren Hilfsstoffen) hergestellt werden. Die Granulate können dabei entweder durch Feuchtgranulation mit z.B. wäßrigen Granulierflüssigkeiten und anschließender Trocknung dieser Granulate oder durch Trockengranulation z.B. über Kompaktierung hergestellt werden.

20

■ **Direktverpressung**

25

z.B. pro Tablette:	25 mg	erfindungsgemäße Verbindung
	271 mg	Ludipress TM (Granulat zur Direkttablettierung aus Lactose monohydrat, Povidon K30 und Crospovidon)
	4 mg	Magnesiumstearat
	300 mg	Gesamt

30

Homogene Mischung des Wirkstoffes mit den Hilfsstoffen herstellen und diese auf einer Tablettenpresse zu Tabletten mit einem Ø von 10 mm verpressen.

5

▪ Trockengranulation

10

z.B. pro Tablette:	25 mg	erfindungsgemäße Verbindung
	166 mg	Microcristalline Cellulose
	80 mg	Niedrig substituierte Hydroxypropylcellulose (I-HPC LH 11™)
	5 mg	Hochdisperses Siliziumdioxid
	4 mg	Magnesiumstearat
	<hr/>	
	280 mg	Gesamt

15

Homogene Mischung der Verbindung mit der Mikrokristallinen Cellulose und der I-HPC herstellen und diese Kopaktieren. Nach dem Sieben der Komprimat wird das entstandene Granulat mit Magnesiumstearat und Siliziumdioxid gemischt und auf einer Tablettenpresse zu Tabletten mit einem Ø von 9 mm verpreßt.

20

▪ Feuchtgranulation

25

30

z.B. pro Tablette:	25 mg	erfindungsgemäße Verbindung
	205 mg	Mikrokristalline Cellulose
	6 mg	Povidon K30
	10 mg	Crospovidon
	4 mg	Magnesiumstearat
	<hr/>	
	250 mg	Gesamt

5 Homogene Mischung der Verbindung mit der Mikrokristallinen Cellulose und dem Crospovidon herstellen und diese in einem Granulator mit einer wäßrigen Lösung des Povidons granulieren. Das feuchte Granulat wird anschließend nachgranuliert und nach der Trocknung im Trockenschrank (50°C) 10 h getrocknet. Das trockene Granulat wird mit dem Magnesiumstearat zusammen gesiebt, endgemischt und auf einer Tablettenpresse zu Tabletten mit einem Ø von 8 mm verpreßt.

10

Beispiel 8:

Beispiel für ein Arzneimittel zur Schmerzbehandlung enthaltend eine erfindungsgemäße Verbindung – parenterale Lösung

15 1 g einer erfindungsgemäßen Verbindung wird in 1 l Wasser für Injektionszwecke bei Raumtemperatur gelöst und anschließend durch Zugabe von NaCl (Natriumchlorid) auf isotone Bedingungen eingestellt.

Literatur:

5 Aihara Y, Mashima H. Onda H. Hisano Setsuji, Kasuya H., Hori T. Yamada S., Tomura H. Yamada Y., Inoue I., Kojima I. und Takeda J. (2000), J. Neurochem. 74: 2622 - 2625

Akopian AN, Sivilotti L & Wood JN (1995) Nature 379: 257-262

Ausubel FM, Brent R, Kingdon RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA & Struhl K eds.(1990) Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, Inc. New York, NY.

10 Baba H, Doubell TP, Woolf CJ 1999: Peripheral inflammation facilitates A β fiber-mediated synaptic input to the substantia gelatinosa of the adult rat spinal cord. J Neurosci 19: 859-867

15 Bauer D, Müller H, Reich J, Riedel H, Ahrenkiel V, Warthoe P & Strauss M (1993): Identification of differentially expressed mRNA species by an improved display technique (DDRT-PCR) Nucl Acids Res 21: 4272-4280.

Bonini A, Anderson SM, Steiner DF (1997) Molecular cloning and tissue expression of a novel orphan G Protein-coupled receptor from rat lung. Biochem Biophys Res Comm 234: 190-193.

20 Chih-Cheng et al., (1995): A P2X prinoceptor expressed by a subset of sensory neurons. Nature 377:428-432

Corderre TJ, Katz J, Vaccarino AL, Melzack R (1993): Contribution of central plasticity to pathological pain: review of clinical and experimental evidence. Pain 52: 259-285.

25 Dickenson (1995) Novel pharmacological targets in the treatment of pain. Pain Rev., 2, 1-12.

Dubuisson et al., 1997 Pain, 4:161-174.

Feng Y & Gregor P (1997) Cloning of a novel member of the G Protein-coupled receptor family related to peptide receptors. Biochem Biophys Res Comm 231: 651-654.

Furukawa T, Yang Y, Nakamoto B, Stamatoyannopoulos G, Papayannopoulou T (1996): Identification of new genes expressed in a human erythroleukemia cell line. *Bloods Cell Mol & Dis* 22:11-22.

5 Gunasekar PG, Kanthasamy, AG, Borowitz JL, Isom GE 1995: NMDA receptor activation produces concurrent generation of nitric oxide and reactive oxygen species: implication for cell death. *J Neurochem* 65: 2016-2021.

10 Hawes BE, Fried S, Yao X, Weig B, Graziano MP 1998: Nociceptin (ORL1) and μ -Opioid receptors mediate mitogen-activated protein kinase activation in CHO cells through a Gi-coupled signaling pathway: evidence for distinct mechanisms of agonist-mediated desensitization. *J Neurochem* 71: 1024-1033.

15 Hubank M & Schatz DG (1994): Identifying differences in mRNA expression by representational difference analysis of cDNA. *Nucl Acids Res* 22: 5640-5648.

Klußmann S et al., 1996: *Nature Biotechnology* 14: 1112-1115.

Li L-Y & Chang K-J 1996: The stimulatory effect of opioids on mitogen-activated protein kinase in chinese hamster ovary cells transfected to express μ -opioid receptors. *Mol Pharm* 50:599-602.

20 Liang P & Pardee AB 1992: Differential Display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257:967-971.

25 Methner A, Hermey G, Schinke B, Hermanns-Borgmeyer I (1997): A novel G Protein-coupled receptor with homology to neuropeptide and chemoattractant receptors expressed during bone development. *Biochem Biophys Res Comm* 233: 336-342.

Mohit AA, Martin JH & Miller CA 1995: p493F12 Kinase: a novel MAP kinase expressed in a subset of neurons in the human nervous system. *Neuron* 14: 67-78.

Poirier GM-C, Pyati J, Wan JS, Erlander MG 1997: Screening differentially expressed cDNA clones obtained by differential display using amplified RNA. *Nucleic Acids Research* 25: 913-914.

5 Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T 1989: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.

Sompayrac L, Jane S, Burn TC, Tenen DG & Danna KJ 1995: Overcoming limitations of the mRNA differential display technique. *Nucleic Acids Research* 23: 4738-4739.

10 Tal M 1996: A novel antioxidant alleviates heat hyperalgesia in rats with an experimental painful neuropathy. *Neuroreport* 7: 1382-1384.

Tölle TR (1997): Chronischer Schmerz. In: *Klinische Neurobiologie*, Herdergen T, Tölle TR, Bähr M (Hrsg.): S. 307-336; Spektrum Verlag, Heidelberg.

15 U.S.Patent 5.262.311

Velculescu VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995): Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487.

Wan JS, Sharp JS et al. (1996): Cloning differentially expressed mRNAs *Nature Biotech* 14:1685-1691.

20 Watson JB & Margulies JE (1993) Differential cDNA screening strategies to identify novel stage-specific proteins in the developing mammalian brain. *Dev Neurosci* 15: 77-86.

25 Wilks AF (1989) Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 1603-1607.

WO96/34288

Woolf CJ, Shortland P, Coggeshall RE 1992: Peripheral nerve injury triggers central sprouting of myelinated afferents. *Nature* 355:75-78.

Zimmermann, M & Herdegen, T (1996): Plasticity of the nervous system at

the systemic, cellular and molecular levels: a mechanism of chronic pain and hyperalgesia. *Progr Brain Res* 110: 233-259

Patentansprüche

5 1. Verfahren zur Auffindung schmerzregulierender Substanzen mit folgenden Verfahrensschritten:

10 (a) Inkubation einer zu testenden Substanz unter geeigneten Bedingungen mit dem Protein BNPI oder DNPI und/oder einem Protein gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder einem zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnliches Protein und/oder einem Protein, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder einem Protein, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder deren Antisense Polynukleotide binden, oder einem mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langes Teilprotein eines der vorgenannten Proteine und/oder einer Zelle und/oder einer Präparation aus einer solchen Zelle, die mindestens eines der vorgenannten Proteine und Teilproteine synthetisiert hat,

15 20 (b) Messung der Bindung der Testsubstanz an dem von der Zelle synthetisierten Protein oder Teilprotein oder Messung mindestens eines der durch die Bindung der Testsubstanz an das Protein oder Teilprotein veränderten funktionellen Parameter.

25 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle vor dem Schritt (a) gentechnisch manipuliert wird.

30

3. Verfahren gemäß Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die gentechnische Manipulation die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen Parameter erlaubt.
- 5 4. Verfahren gemäß Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß durch die gentechnische Manipulation eine in der Zelle nicht endogen exprimierte Form eines G-Proteins exprimiert oder ein Reportergen eingeführt wird.
- 10 5. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2-4, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle gentechnisch so manipuliert wird, daß die Zelle mindestens ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid enthält.
- 15 6. Verfahren gemäß Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Polynukleotid in einem rekombinanten DNA-Konstrukt enthalten ist.
- 20 7. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 2 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle nach der gentechnischen Manipulation gemäß Anspruch 2 und vor dem Schritt (a) gemäß Anspruch 1 unter Bedingungen, die eine Expression erlauben, kultiviert wird, gegebenenfalls unter Selektionsdruck.
- 25 8. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder eine immortalisierte oder native Säugetierzelle ist.
- 30 9. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Messung der Bindung über die Verdrängung eines bekannten markierten Liganden des Teilproteins oder Proteins

und/oder über die daran gebundene Aktivität einer markierten Testsubstanz erfolgt.

- 5
10. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß die Messung mindestens eines der durch die Testsubstanz veränderten funktionellen Parameter über Messung der Regulation, Hemmung und/oder Aktivierung von Rezeptoren, Ionenkanälen und/oder Enzymen erfolgt, insbesondere über Messung der Veränderung der Genexpression, des Ionenmilieus, des pH oder des Membranpotentials, über Veränderung der Enzymaktivität oder der Konzentration der 2nd messenger.
- 10
11. Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der durch die aufzufindende Substanz regulierte Schmerz ausgewählt ist aus:
- 15
- chronischem Schmerz, insbesondere muskuloskelettalem Schmerz; neuropathischem Schmerz, insbesondere allodynischem Schmerz, mechanischer Hyperalgesie oder diabetischer Neuropathie; viszeralem Schmerz, cerebralem Schmerz, peripherem Schmerz oder entzündungsbedingtem Schmerz, insbesondere peripherem Entzündungsschmerz; sowie Migräne, Cluster-Kopfschmerz oder den Schmerz bei Trigemini Neuralgie.
- 20
12. Verbindung identifizierbar als schmerzregulierende Substanz durch ein Verfahren gemäß einem der Ansprüche 1 bis 11.
- 25
13. Verbindung gemäß Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß sie eine niedermolekulare Verbindung ist.
- 30
14. Verwendung

- 5
- a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- 10
- b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- 15
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,
- 20
- d. von BNPI oder DNPI und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnlichen Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder dessen Antisense Polynukleotide bindet oder eines mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15,
- 25
- 30

insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine, wobei das Protein oder Teilprotein gegebenenfalls posttranslational modifiziert, insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde,

- e. eines Antikörpers, vorzugsweise eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers, gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)
- g. einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13 und/oder
- h. eines Wirkstoffs, vorzugsweise eines niedermolekularen Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,

zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Schmerz.

15. Verwendung

- a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,

5

b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,

10

c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,

15

f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b) oder einen Vektor gemäß Punkt c)

20

zur Herstellung eines Arzneimittels zum Einsatz in der Gentherapie.

25

16. Verwendung gemäß Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um In-vivo oder In-vitro Gentherapie handelt.

17. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 15 oder 16, dadurch gekennzeichnet, daß es sich um ein Arzneimittel zur Behandlung von Schmerz handelt.

30

18. Verwendung

- a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,
- b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,
- d. von BNPI oder DNPI und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnlichen Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder dessen Antisense Polynukleotide bindet oder eines mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen

Teilproteins eines der vorgenannten Proteine, wobei das Protein oder Teilprotein gegebenenfalls posttranslational modifiziert, insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde,

- e. eines Antikörpers, vorzugsweise eines monoklonalen oder polyklonalen Antikörpers, gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),
- f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e),
- g. einer Verbindung gemäß einem der Ansprüche 12 oder 13 und/oder
- h. eines Wirkstoffs, vorzugsweise eines niedermolekularen Wirkstoffs, der an ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt a) bindet,

zur Herstellung eines Diagnostikums zur Diagnose eines Schmerzzustandes.

19. Verwendung

- a. eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, kodierend für BNPI oder DNPI oder eines Polynukleotids, vorzugsweise einer DNA oder RNA, welches einer der in einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a), 2c) oder 2e) dargestellten Nukleotidsequenzen zu wenigstens 90%, vorzugsweise 95%, insbesondere zu wenigstens 97% entspricht,

- 5 b. eines Polynukleotids, insbesondere eines Antisense Polynukleotids oder einer PNA, vorzugsweise eines DNA-Enzyms oder Ribozyms, eines Ribozyms oder sonstigen DNA-Enzyms oder einer katalytischen RNA oder DNA, das eine Nukleotid-Sequenz aufweist, die in der Lage ist, spezifisch an eines der unter Punkt a) aufgeführten Polynukleotide zu binden,
- 10 c. eines Vektors enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), insbesondere eines Expressionsvektors und/oder insbesondere abgeleitet von einem Virus, beispielsweise dem Adenovirus, Adenoassoziiertem Virus oder Herpesvirus und/oder insbesondere enthaltend mindestens eine LTR-, Poly A-, Promotor- und/oder ORI-Sequenz,
- 15 d. von BNPI oder DNPI und/oder eines Proteins gemäß einer der Abbildungen 1b), 1d), 1f), 2b) oder 2d) und/oder eines zu einem dieser vorgenannten Proteine zu mindestens 90 % ähnlichen Proteins und/oder eines Proteins, für das ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder ein dazu zu mindestens 90 % ähnliches Polynukleotid kodiert, und/oder eines Proteins, das durch eine Nukleinsäure kodiert wird, die unter
- 20 stringenten Bedingungen an ein Polynukleotid gemäß einer der Abbildungen 1a), 1c), 1e), 2a) oder 2c) oder dessen Antisense Polynukleotide bindet oder eines mindestens 10, vorzugsweise mindestens 15, insbesondere mindestens 20 Aminosäuren langen Teilproteins eines der vorgenannten Proteine, wobei das Protein oder Teilprotein gegebenenfalls posttranslational modifiziert, insbesondere glykosiliert, phosphoryliert, amidiert, methyliert, acetyliert, ADP-ribosyliert, hydroxyliert, mit einem Membrananker versehen, gespalten oder verkürzt wurde,
- 25 e. eines Antikörpers, vorzugsweise eines monoklonalen oder
- 30 polyklonalen Antikörpers, gegen eines der Proteine oder Teilproteine gemäß Punkt d),

- 5 f. einer Zelle, vorzugsweise einer Amphibienzelle, Bakterienzelle, Hefezelle, Insektenzelle oder einer immortalisierten oder nativen Säugetierzelle, enthaltend ein Polynukleotid gemäß einem der Punkte a) oder b), einen Vektor gemäß Punkt c), ein Protein oder Teilprotein gemäß Punkt d) oder einen Antikörper gemäß Punkt e)

in einem Verfahren zur Auffindung schmerzregulierender Substanzen.

- 10 20. Verwendung gemäß einem der Ansprüche 14, 17, 18 oder 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Schmerz ausgewählt ist aus

15 chronischem Schmerz, insbesondere muskuloskelettalem Schmerz; neuropathischem Schmerz, insbesondere allodynischem Schmerz, mechanischer Hyperalgesie oder diabetischer Neuropathie; viszeralem Schmerz, cerebralem Schmerz, peripherem Schmerz oder entzündungsbedingtem Schmerz, insbesondere peripherem Entzündungsschmerz; sowie Migräne, Cluster-Kopfschmerz oder dem Schmerz bei Trigeminus Neuralgie.

Fig. 1a)

cgggcggcag	gagccgccac	catggagttc	cgccaggagg	agtttcggaa	gctagcgggt	60
cgtgctctcg	ggaagctgca	ccgccttctg	gagaagcggc	aggaaggcgc	ggagacgctg	120
gagctgagtg	cgatggggcg	cccggtgacc	acgcagaccc	gggacccgcc	ggtggtggac	180
tgcacctgct	tggcctccc	tcgcgcgtac	attatcgcca	tcatgagtgg	tctgggcttc	240
tgcatacagct	ttggcatccg	ctgcaacctg	ggcgtggcca	tcgtctccat	ggtcaataac	300
agcacgaccc	accgcggggg	ccacgtggtg	gtgcagaaag	cccagttcag	ctgggatcca	360
gagactgtcg	gcctcataca	cggtcccttt	ttctggggct	acattgtcac	tcagattcca	420
ggaggattta	tctgtcaaaa	at ttgcagcc	aacagagttt	tcggcctttgc	tattgtggca	480
acatccactc	taaacatgct	gatccctca	gctgcccgcg	tccactatgg	ctgtgtcatc	540
ttcgtgagga	tcctgcaggg	gttggtagag	ggggtcacat	acccgcctg	ccatgggatc	600
tggagcaa at	gggccccacc	cttagaacgg	agtcgcctgg	cgacgacagc	cttttgtggg	660
tcctatgctg	gggcggtggt	cgcgatgccc	ctcgccgggg	tccttgtgca	gtactcagga	720
tggagctctg	ttttctacgt	ctacggcagc	ttcgggatct	tctgggtacct	gttctggctg	780
ctcgtctcct	acgagtcccc	cgcgctgcac	cccagcatct	cggaggagga	gcgcaagtac	840
atcgaggacg	ccatcggaga	gagcgcgaaa	ctcatgaacc	ccctcacgaa	gttttagcact	900
ccctggcggc	gcttcttcac	gtctatgcca	gtctatgcca	tcactgtggc	caacttctgc	960
ggcagctgga	cgttctacct	gctgctcatc	tcccagcccc	cctacttcga	agaagtgttc	1020
ggcttcgaga	tcagcaaggt	aggcctgggt	tcgcgcgtgc	cccacctggg	catgaccatc	1080
atcgtgccca	tcggcgggcca	gatcgcgagc	ttcctgcgga	gccgcgcgat	catgtccacc	1140
accaacgtgc	gcaagttgat	gaactgcgga	ggcttcggca	tggaagccac	gctgctgttg	1200
gtggtcggct	actcgcactc	caagggcggtg	gccatctcct	tcctgggtcct	agccgtgggc	1260
ttcagcggct	tcgccatctc	tgggttcaac	gtgaaccacc	tggacatagc	ccgcgcgtac	1320
gccagcatcc	tcattgggcat	ctccaacggc	gtgggcacac	tgtcgggcat	ggtgtgcccc	1380
atcatcgtgg	gggcatgac	taagcacaag	actcgggagg	agtggcagta	cgtgttccta	1440
attgcctccc	tgggtgacta	tggaggtgtc	atcttctacg	gggtctttgc	ttctggagag	1500
aagcagccgt	gggcagagcc	tgaggagatg	agcgaggaga	agtgtggctt	cgttggccat	1560
gaccagctgg	ctggcagtgga	cgacagcgaa	atggaggatg	aggctgagcc	cccgggggca	1620
ccccctgcac	ccccgccctc	ctatggggcc	acacacagca	catttcagcc	ccccaggccc	1680
ccacccccctg	tcggggacta	ctgaccatgt	gcctcccact	gaatggcagt	ttccaggacc	1740
tccattccac	tcattctctgg	cctgagtgac	agtgtcaagg	aaccctgctc	ctctctgtcc	1800
tgcctcaggc	ctaagaagca	ctctcccttg	ttcccagtg	tgtcaaatcc	tcttctcttc	1860
ccaattgcct	ctcaggggta	gtgaagctgc	agactgacag	tttcaaggat	acccaaattc	1920
ccctaaaggt	tcctcttcca	cccgttctgc	ctcagtgggt	tcaaatctct	cctttcaggg	1980
ctttat ttga	atggacagtt	cgacctctta	ctctctcttg	tggttttgag	gcacccacac	2040
cccccgcttt	cctttatctc	cagggactct	caggctaacc	tttgagatca	ctcagctccc	2100
atctcctttc	agaaaaattc	aaggtcctcc	tctagaagtt	tcaaatctct	cccaactctg	2160
ttctgcatct	tccagattgg	tttaaccaat	tactcgtccc	cgccattcca	gggattgatt	2220
ctcaccagcg	tttctgatgg	aaaatggcgg	tttcaagtcc	cggattccgt	gcccacttca	2280
catctcccct	accagcagat	tctgcgaaag	caccaaattt	ctcaagaccc	tcttctccct	2340
agcttagcat	aatgtctggg	gaaaca				

Fig. 1b)

1	MEFRQEEFRK	LAGRALGKLH	RLLEKRQEGA	ETLELSADGR	PVTTQTRDPP
51	VVDCTCFGLP	RRYIIAIMSG	LGFCISFGIR	CNLGVAIVSM	VNNSTTHRGG
101	HVVVQKAQFS	WDPETVGLIH	GSFFWGYIVT	QIPGGFICQK	FAANRVFGFA
151	IVATSTLNML	IPSAARVHYG	CVIFVRILQG	LVEGVTPAC	HGIWSKWAPP
201	LERSRLATTA	FCGSYAGAVV	AMPLAGVLVQ	YSGWSSVFYV	YGSFGIFWYL
251	FWLLVSYESP	ALHPSISEEE	RKYIEDAIGE	SAKLMNPLTK	FSTPWRRFFT
301	SMPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFEISKV	GLVSALPHLV
351	MTIIVPIGGQ	IADFLRSRRI	MSTTNVRKLM	NCGGFGMEAT	LLLVVGYSHS
401	KGVAISFLVL	AVGFSGFAIS	GFNVNHLDA	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM
451	VCPIIVGAMT	KHKTREEWQY	VFLIASLVHY	GGVIFYGVFA	SGEKQPWAEP
501	EEMSEEKCGF	VGHDQLAGSD	DSEMEDEAEP	PGAPPAPPPS	YGATHSTFQP
551	PRPPPPVRDY				

Fig. 1c)

cgataagctt	gatatcgaat	tccggactct	tgtctcggg	ccttaaccg	gcgttcggtt	60
catcccgcag	cgccagttct	gcttaccaaa	agtggcccac	taggcactcg	cattccacgc	120
ccggctccac	gccagcgagc	cgggcttctt	acccatttaa	agtttgagaa	taggttgaga	180
tcgtttcggc	cccaagacct	ctaatacttc	gctttaccgg	ataaaaactgc	gtggcggggg	240
tgcgtcgggt	ctgcgagagc	gccagctatc	ctgagggaaa	cttcggaggg	aaccagctac	300
tagatggttc	gattagtctt	tcgcccctat	acccaggtcg	gacgaccgat	ttgcacgtca	360
ggaccgctac	ggacctccac	cagagtttcc	tctggcttcg	ccctgccag	gcgatcggcg	420
gggggggacc	gcggggtgac	cggcggcagg	agccgccacc	atggagtctc	gccaggagga	480
gtttcgggaag	ctagcgggtc	gtgctctcgg	gaagctgcac	cgccttctgg	agaagcggca	540
ggaaggcgcg	gagacgctgg	agctgagtgc	ggatggggcg	ccggtgacca	cgcagacccg	600
ggaccgcgcg	gtggtggact	gcacctgctt	cggcctccct	cgcgcgtaca	ttatcgccat	660
catgagtgg	ctgggcttct	gcatacagctt	tggcatccgc	tgcaacctgg	gcgtggccat	720
cgtctccatg	gtcaataaca	gcacgaccca	ccgcgggggc	cacgtgggtg	tgcagaaagc	780
ccagttcagc	tgggatccag	agactgtcgg	cctcatacac	ggctcctttt	tctggggcta	840
cattgtcact	cagattccag	gaggatttat	ctgtcaaaaa	tttgagacca	acagagtttt	900
cggctttgct	attgtggcaa	catccactct	aaacatgctg	atcccctcag	ctgccgcgt	960
ccactatggc	tgtgtcatct	tcgtgaggat	cctgcagggg	ttggtagagg	gggtcacata	1020
cccgccctgc	catgggatct	ggagcaaatg	ggccccaccc	ttagaacgga	gtcgcctggc	1080
gacgacagcc	ttttgtgggt	cctatgctgg	ggcgggtggtc	gcgatgcccc	tcgccggggg	1140
ccttgtgcag	tactcaggat	ggagctctgt	tttctacgtc	tacggcagct	tcgggatctt	1200
ctggtacctg	ttctggtgc	tcgtctccta	cgagtccccc	gcgctgcacc	ccagcatctc	1260
ggaggaggag	cgcaagtaca	tcgaggacgc	catcggagag	agcgcgaaac	tcatgaaccc	1320
cctcacgaag	tttagcactc	cctggcggcg	cttcttcacg	tctatgccag	tctatgccat	1380
cactgtggcc	aacttctgcc	gcagctggac	gttctacctg	ctgctcatct	cccagcccga	1440
ctacttcgaa	gaagtgttcg	gcttcgagat	cagcaaggta	ggcctgggtg	ccgcgctgcc	1500
ccacctgggtc	atgaccatca	tcgtgcccat	cggcggccag	atcgcggact	tcctgcggag	1560
ccgcgcgcatc	atgtccacca	ccaacgtgcg	caagttgatg	aactgcggag	gcttcggcat	1620
ggaagccacg	tcgtgtttgg	tggtcggcta	ctcgcactcc	aagggcgtgg	ccatctcctt	1680
cctggctccta	gccgtgggtc	tcagcggctt	cgccatctct	gggttcaacg	tgaaccacct	1740
ggacatagcc	ccgcgctacg	ccagcatcct	catgggcate	tccaacggcg	tgggcacact	1800
gtcgggcatg	gtgtgcccc	tcacgtggg	ggccatgact	aagcacaaga	ctcgggagga	1860
gtggcagtac	gtgttcctaa	ttgcctccct	ggtgcactat	ggaggtgtca	tcttctacgg	1920
ggtctttgct	tctggagaga	agcagccgtg	ggcagagcct	gaggagatga	gcgaggagaa	1980
gtgtggcttc	gttggccatg	accagctggc	tggcagtgac	gacagcgaaa	tggaggatga	2040
ggctgagccc	ccgggggcac	ccccctgcacc	ccgcctctcc	tatggggcca	cacacagcac	2100
atttcagccc	cccaggcccc	cacccctgtg	ccgggactac	tgacctgtg	cctcccactg	2160
aatggcagtt	tccaggacct	ccattccact	catctctggc	ctgagtgaca	gtgtcaagga	2220
accctgctcc	tctctgtcct	gcctcaggcc	taagaagcac	tctcccttgt	tcccagtgt	2280
gtcaaatcct	ctttccttcc	caattgcctc	tcaggggtag	tgaagctgca	gactgacagt	2340
ttcaaggata	cccaaattcc	cctaaagggt	ccctctccac	ccgttctgcc	tcagtgggtt	2400
caaatctctc	ctttcagggc	tttatttgaa	tggacagttc	gacctcttac	tctctcttgt	2460
ggttttgagg	cacccacacc	ccccgctttc	ctttatctcc	agggactctc	aggctaacct	2520
ttgagatcac	tcagctccca	tctcctttca	gaaaaattca	aggctcctct	ctagaagtgt	2580
caaatctctc	ccaactctgt	tctgcatctt	ccagattggg	ttaaccaatt	actcgtcccc	2640
gccattccag	ggattgatcc	tcaccagcgt	ttctgatgga	aaatggcggg	aattcctgca	2700
gcccggggga	tccact					2716

Fig. 1d)

1	MEFRQEEFRK	LAGRALGKLH	RLLEKRQEGA	ETLELSADGR	PVTTQTRDPP
51	VVDCTCFGLP	RRYIIAIMSG	LGFCISFGIR	CNLGVAIVSM	VNNSTTHRGG
101	HVVVQKAQFS	WDPETVGLIH	GSFFWGYIVT	QIPGGFICQK	FAANRVFGFA
151	IVATSTLNML	IPSAARVHYG	CVIFVRILQG	LVEGV TYPAC	HGIWSKWAPP
201	LERSRLATTA	FCGSYAGAVV	AMPLAGVLVQ	YSGWSSVFYV	YGSFGIFWYL
251	FWLLVSYESP	ALHPSISEEE	RKYIEDAIGE	SAKLMNPLTK	FSTPWR RFFT
301	SMPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPDYFE	EVFGFEISKV	GLVSALPHLV
351	MTIIVPIGGQ	IADFLRSRRI	MSTTNVRKLM	NCGGFGMEAT	LLLVVGYSHS
401	KGVAISFLVL	AVGFSGFAIS	GFNVNHLDI	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM
451	VCPIIVGAMT	KHKTREEWQY	VFLIASLVHY	GGVIFYGVFA	SGEKQPW AEP
501	EEMSEEKCGF	VGHDQLAGSD	DSEMEDEAEP	PGAPPAPPPS	YGATHSTFQP
551	PRPPPPVRDY				

Fig. 1e)

gaattcggca	cgagcggagc	tgcggggccg	ggccgggccc	gggcggaccc	cgggatcccg	60
gacgcggccc	cccgggcccg	cgggcggggg	gattggcagg	ggacccgcgt	gggcacagcc	120
accatggagt	tccggcagga	ggagtttcgg	aagctggcgg	ggcgcgccct	ggggaggctg	180
caccggttac	tggagaagcg	gcaggaaggc	gcggagacat	tggagctgag	cgccgacggg	240
cgcacagtga	ccacacacac	gcgggacccc	ccggtggtgg	actgcacttg	ctttggcctc	300
cctcgccgct	acatcatcgc	gatcatgagc	ggctctgggt	tctgcatcag	ctttggcatc	360
cgctgcaacc	tgggcgtggc	catcgtatcc	atgggtcaaca	acagtacaac	ccaccgtggg	420
ggccacgtgg	tgggtgcagaa	agcccagttc	aactgggatac	cagagactgt	cggcctcata	480
catggctcct	ttttctgggg	gtacattgtc	actcagattc	ctggaggatt	tatctgcca	540
aaattcgcag	ccaacagggt	ctttggcttt	gccattgtgg	ctacctccac	cctaaatatg	600
ttgatccctt	cagcagcccg	tgttactat	ggctgtgtca	tcttcgtgag	gatccttcag	660
ggattggtgg	agggggtcac	ataccctgct	tgccatggca	tctggagcaa	atgggcccct	720
cccttagaac	ggagtcggct	ggcgacgaca	gcctttttgcg	gttcctatgc	cggggcagtg	780
gttgccatgc	ctctggctgg	ggtcctggta	cagtattcag	gatggagttc	tgtcttctat	840
gtctatggca	gcttcgggat	cttttggtac	ctgttctggg	tgttgtctc	ctacgagtca	900
cctgcactac	accccagcat	ctccgaggag	gagcgcaaat	acattgagga	tgccatcgga	960
gaaagcgcca	agctcatgaa	ccctgttacg	aagtttaaca	caccctggag	gcgcttcttt	1020
acctccatgc	cggctcatgc	catcattgtc	gccaaacttt	gccgcagctg	gactttctac	1080
ctgctcctca	tctcccagcc	cgcctacttt	gaagaagtgt	tcggttttga	gatcagcaag	1140
gtgggactgg	tgtcggcact	gcctcacctt	gtcatgacta	tcatcgtaac	catcggaggc	1200
cagatcgccg	acttcctgcg	cagtcgtcat	ataatgtcca	cgaccaatgt	gcgaaagctg	1260
atgaactgcg	gggggttcgg	gatggaagct	acgctgctgc	tggtggtcgg	atactcacac	1320
tccaagggcg	tggccatctc	cttcctggtc	ctggctgtgg	gcttcagtgg	ctttgctatc	1380
tctgggttta	acgtgaacca	cttggacatc	gcccctcgat	atgccagcat	cttgatgggc	1440
atttccaatg	gcgtgggcac	actgtctggg	atgggtgtgcc	ccatcatcgt	gggtgcaatg	1500
accaagcaca	agacgcggga	ggagtggcag	tacgtgttcc	tcatagcctc	cctggtgcac	1560
tatggagggtg	tcattcttcta	tggggtcttt	gcttcgggag	agaaacagcc	gtgggcagag	1620
ccggaggaga	tgagcgagga	gaagtgtggc	tttgttggcc	acgaccagct	ggctggcagt	1680
gacgaaagtg	aaatggaaga	cgaggttgag	cccccgggg	cacccccgc	acctccgct	1740
tcctacgggg	ccacacacag	cacagttcag	cctccaaggc	ccccacccc	tgtccgggac	1800
tactgaccac	gtgcctccca	ctggtgggca	gtttccagga	cctccactcg	atacacctct	1860
agcctaaacg	gcagtgtcga	ggaacccac	tcctctcctg	cctcaggctt	aagatgcaag	1920
tcttccttgg	tgcccagtgc	tgtccgacca	gccctctctc	cttctcaact	gcctcttgca	1980
ggggtgaagc	tgcacactag	cagtttcaag	ctcgtgccga	attc		

Fig. 1f)

1	MEFRQEEFRK	LAGRALGRLH	RLLEKRQEGA	ETLELSADGR	PVTTHTRDPP	VVDCTCFGLP
51	RRYIIAIMSG	LGFCISFGIR	CNLGVAIVSM	VNNSTTHRGG	HVVVQKAQFN	WDPETVGLIH
101	GSFFWGYIVT	QIPGGFICQK	FAANRVFGFA	IVATSTLNML	IPSAARVHYG	CVIFVRILQG
151	LVEGVITYPAC	HGIWSKWAPP	LEERSRLATTA	FCGSYAGAVV	AMPLAGVLVQ	YSGWSSVFYV
201	YGSFGIFWYL	FWLLVSYESP	ALHPSISEEE	RKYIEDAIGE	SAKLMNPVTK	FNTPWRRFFT
251	SMPVYAIIVA	NFCRSWTFYL	LLISQPAYFE	EVFGFEISKV	GLVSALPHLV	MTIIVPIGGQ
301	IADFLRSRHI	MSTTNVRKLM	NCGGFGMEAT	LLLVGYSHS	KGVAISFLVL	AVGFSGFAIS
351	GFNVNHLDA	PRYASILMGI	SNGVGTLSGM	VCPIIVGAMT	KHKTREEWQY	VFLIASLVHY
401	GGVIFYGVFA	SGEKQPWAEP	EEMSEEKCGF	VGHDQLAGSD	ESEMEDEVEP	PGAPPAPPPS
451	YGATHSTVQP	PRPPPPVRDY				

acaatacatt	atattaaaaat	ggctctctctc	tatatatatc	tgtatatctt	atacatgtcc	3300
atacacagaa	acataataaaa	caatcttcac	acgaaaccaa	aaatagcata	cacctaattgt	3360
tgggttaggg	aattgcaatt	tctactttca	tagagtcata	gaattttagg	tggggaagag	3420
gcattttgct	tgtcatttct	taatataact	caacaagaat	tgcaacattt	gtgtaccaag	3480
caataagtgc	aatgcataaa	atttcctgtc	tgtatattac	cttcattttg	cttgtagtag	3540
ctgtttgggt	ggttggaata	attttatttt	tcttttaaaa	aagctaacat	cagacccctt	3600
tataatgtcc	taaaattatg	ataatacatt	tccaattca	actcaaaata	ttattggtgt	3660
attttgtcta	ttctggatat	ttgatctgtt	taatgtactg	tgctagtgc	tggaggccct	3720
gctactgcaa	atataaaacc	taaagtttgt	ttaaaaaaat	gcaaatcatt	ctttacctta	3780
agaaaaaaaa	aatacccttt	gctttgtgcc	tcaaagtgat	gtaatgtgat	cacagctttt	3840
gttgtgttga	atgaaaatat	gtggactgtc	attttgttgc	agcaaaaaag	tgттаataaa	3900
atgctctatt	tatccttttt	taaaaaaaaa	aaaaaaaaaa	aaaaaa		

Fig. 2a)

cgtttaaaag	ccatcagatt	tgagagcaat	aagtcttcaa	aaccgggaat	ttacattggt	60
tttcagctga	ccgacttcca	ggaaaaggac	tcaaccgcat	ctacccaaat	accgtggcac	120
tgcttgcgct	ctttgccacc	ggatactccc	cttccaatga	gacttttctga	ttgtgtctac	180
caactctcct	attaggaaac	ccgtgggttg	catgcagcta	ttctgttgta	ttctcattct	240
cactctccct	cccttctctc	actctcactc	ttgctggagg	cgagccacta	ccattctgct	300
gagaaggaaa	agcccgcac	tactttaaga	gattaagaca	atatgcgcaa	tcctcgctt	360
tcctagcaat	cactatttaa	atctggcaag	aactgacaac	agtctttgca	agaatggaat	420
ccgtaaaaca	aaggattttg	gccccaggaa	aagaggggct	aaagaatttt	gctggaaaat	480
cactcggcca	gatctacagg	gtgctggaga	agaagcaaga	caccggggag	acaatcgagc	540
tgacggagga	tgggaagccc	ctagaggtgc	ccgagaggaa	ggcgccgctg	tgcgactgca	600
cgtgcttcgg	cctgccccgc	cgctacatta	tcgccatcat	gagcggcctg	ggcttctgca	660
tctccttcgg	tatccgctgc	aacctgggcg	tggccattgt	ggacatggtc	aacaacagca	720
ccatccaccg	cgggggcaag	gtcatcaagg	agaaagccaa	attcaactgg	gacccggaaa	780
ccgtggggat	gatccacggt	tccttctttt	ggggctacat	catcactcag	attccgggag	840
gctacatcgc	gtctcggctg	gcagccaaca	gggttttcgg	agctgccata	cttcttacct	900
ctaccctaaa	tatgctaatt	ccatcagcag	ccagagtgc	ttatggatgt	gtcatctttg	960
tcagaatact	gcagggactt	gttgaggggtg	tgacctaccc	agcatgtcat	gggatatgga	1020
gcaaattggc	cccacctcta	gagaggagta	gactggcaac	cacctccttt	tgtgggtcct	1080
atgccggagc	tgtgattgca	atgccttttag	ctggcattct	tgtgcagtac	actggctggt	1140
cttcagtgtt	ttatgtctac	ggaagctttg	gaatggctctg	gtacatgttt	tggcttttgg	1200
tgtcttatga	aagtcttgca	aagcatccta	ctattacaga	tgaagaacgt	aggtacatag	1260
aagaaagcat	tggagagagt	gcaaactctt	taggtgcaat	ggaaaaattc	aagactccat	1320
ggaggaagtt	ttttacatcc	atgccagtct	atgcaataat	tgttgcaaac	ttctgcagaa	1380
gctggacttt	ttattttattg	cttattagtc	agccagcata	ttttgaggaa	gtcttttgat	1440
ttgaaattag	caaggttggt	atgctatctg	ctgtgccaca	cttagtaatg	acaattattg	1500
tgcctatttg	gggacaaatt	gcagattttc	taagaagcaa	gcagattctt	tcaactacga	1560
cagtgaagaa	gatcatgaat	tgtggtggtt	ttggcatgga	agccacactg	ctcctggctg	1620
ttggctattc	tcatactaga	ggggtagcaa	tctcattctt	ggtacttgca	gtgggattca	1680
gtgattttgc	tatatctggt	ttcaatgtta	accacttgga	tatcgctcca	agatatgcca	1740
gtatcttaat	gggcatttcg	aatggtgttg	gcacattgtc	aggaatggtt	tgtcctatca	1800
ttgttggtgc	aatgacaaag	aataagtcac	gtgaagagt	gcagtatgtc	ttcctgatcg	1860
ctgccctagt	ccactatggt	ggagtatat	tttatgcaat	atttgccctca	ggagagaaac	1920
aaccttgggc	agaccgcgag	gaaacaagt	aagaaaaatg	tggatttatt	catgaagatg	1980
aactcgatga	agaaacagg	gacattactc	aaaattatat	aaattatggt	accaccaagt	2040
cttatgggtg	cacaacacag	gccaatggag	gttggcctag	tgggtgggaa	aagaaagagg	2100
aattttgtaca	aggagaagta	caagactcac	atagctataa	ggaccgagtt	gattattcat	2160
aacaaaacta	attactggat	ttattttttag	tgtttgtgat	taaattcatt	gtgattgcac	2220
aaaaatttta	aaaacacgtg	atgtaaactt	gcaagcatat	caaccaggca	agtcttgctg	2280
taaaaatgaa	aacaaaacaa	acccatgagg	ttaccatcaa	gtgcaatctg	taaaattgtg	2340
aagttccatc	atttccattc	aagtcaccca	ttcttgcat	tgtgacttaa	aggttgactg	2400
gtcaaaattg	tagaaacaag	tagttaccca	ttggattcat	atgagctaaa	actcatcact	2460
atttactaaa	gcacaacatc	tcactctaca	aaagttaaga	agccaaagct	acttgatcat	2520
gcaaaatgca	cttatatat	tgttacactg	tattgcaaga	tagcacacag	aagttggctg	2580
cgtcaagtag	aggcgacatt	tattaagtga	aatcatgga	gttgggatat	ctctcaatta	2640
aagaaataca	ttgtgaacta	tcagctacaa	agttgtactg	aataactatt	agaattgcat	2700
aatgtgagat	attttggttag	tcctcaaaag	gaatatcttg	cagtgttttc	tatgaaatgc	2760
ttgggcacaa	acacttattt	ctgtgaaaga	gaacatgtaa	gttgaggggt	atgcttcatg	2820
ttcttccatc	catttaccta	atagtatgaa	acagttcaca	tttcaataaa	atcaaaactt	2880
tcatgtagcg	tatcacataa	cttttttgca	aaaaatataa	aaagaaataa	acttcaatgt	2940
attttttatt	acaactttgt	actggttgta	acttgcatta	gaaaaaaaaa	agagatatat	3000
aaaccacaaa	gaatctaata	agaaatttat	tatggagata	tagcccttaa	aatgcaatat	3060
taagaacaaa	gaaatagaaa	atggtttaga	tatctttctt	ccttcataat	taaatactat	3120
atgaaacttg	tgccacagag	ctatatgtaa	tatgaaaaga	ttaacttcat	agagatattg	3180
taagtaggta	attttattat	ttaaagtcct	attaagaaat	atgtgtctta	aatatatag	3240

Fig. 2 b)

1	MESVKQRILA	PGKEGLKNFA	GKSLGQIYRV	LEKKQDTGET	IELTEDGKPL	EVPERKAPLC
51	DCTCFGLPRR	YIIAIMSGLG	FCISFGIRC	N	LGVAIVDMVN	NSTIHRGGKV
101	PETVGMIHGS	FFWGYIITQI	PGGYIASRLA	ANRVFGAAIL	LTSTLNMLIP	SAARVHYGCV
151	IFVRILQGLV	EGVTYPACHG	IWSKWAPPLE	RSRLATTSFC	GSYAGAVIAM	PLAGILVQYT
201	GWSSVFYVYG	SFGMVWYMF	LLVSYESPAK	HPTITDEERR	YIEESIGESA	NLLGAMEKFK
251	TPWRKFFTS	PVYAIIVANF	CRSWTFYLLL	ISQPAYFEEV	FGFEISKVGM	LSAVPHLVMT
301	IIVPIGGQIA	DFLRSKQILS	TTTVRKIMNC	GGFGMEATLL	LVVGYSHTRG	VAISFLVLAV
351	GFSGFAISGF	NVNHLDIAPR	YASILMGISN	GVGTLSGMVC	PIIVGAMTKN	KSREEWQYVF
401	LIAALVHYGG	VIFYAIFASG	EKQPWADPEE	TSEEKCGFIH	EDELDEETGD	ITQNYINYGT
451	TKSYGATTQA	NGGWPSGWEK	KEEFVQGEVQ	DSHSYKDRVD	YS	

Fig. 2c)

agacagtaag	gttcttttgc	ttttttccct	tacacaagga	ttcgaatgacg	tttttggtca	60
atctgattaa	aagacagcgg	atttggttgc	gttaagactt	caaaaccggg	aattttacgtt	120
gtttttcggg	gaggtgactt	ccagaacggg	gactcatcag	cacccgcccc	aataccacgg	180
cactgcgcgc	gccctcggcc	accggatcct	ccccttccaa	tgagactttg	tgactgtgtg	240
taccaattct	cctattagga	aaccctgtgg	ctgaatgcag	ctattccggt	gtactctctt	300
tctcgtcttc	cctccccctt	ccaactcaca	gccttgctga	aaagctcatc	tctgctgaga	360
agaaaacggt	ctaccttaac	ctattaagac	tatgcgcaga	actcgccttt	catagccatc	420
acaattttaa	tctggtaagg	ctggacacga	gtcttttaca	gaatggagtc	ggtaaaacaa	480
aggatttttg	ccccggggaa	agaggggata	aagaattttg	ctggaaaatc	cctcggacag	540
atctacaggg	tgctggagaa	gaagcaggat	aaccgagaga	ccatcgagct	gacagaggac	600
ggcaagcccc	tggaggtgcc	tgagaagaag	gctccgctat	gcgactgtac	gtgcttcggc	660
ctgccgcgcc	gctacatcat	agccatcatg	agcggcctcg	gcttctgcat	ctcctttggt	720
atccgctgta	acctgggtgt	ggccattgtg	gacatggtca	acaacagcac	catccaccgg	780
ggtggcaaag	ttatcaagga	gaaagccaag	tttaactggg	accccgagac	tgtggggatg	840
attcacgggt	cgttcttctg	gggctatata	atcacgcaga	ttccggggcg	atacatcgca	900
ctcgcgactg	ctgctaaccg	ggtctttggg	gctgccatac	tgcttacctc	taccctcaat	960
atgctgatcc	catctgcagc	cagagtgcac	tatggatgcg	tcattctttg	tagaatattg	1020
caaggacttg	tggagggcgt	cacctaccca	gcctgtcacg	ggatatggag	caagtggggc	1080
cctccttttg	agaggagtag	gttggtctac	acctccttct	gtggttccta	tgctggagca	1140
gtcattgcaa	tgccccctag	tggtatcctg	gtgcagtaca	ctggatgggt	ttcagtattt	1200
tacttatatg	gaagcttttg	tatggtctgg	tatatgttct	ggcttctggg	gtcttacgag	1260
agccccgcaa	agcatccaac	cataacagac	gaagaacgta	ggtacataga	agagagcatc	1320
ggggagagcg	caaactctgt	aggagcaatg	gagaaattca	agaccccatg	gaggaagttt	1380
ttcacatcca	tgcccgctct	tgcgataatt	gttgcaaact	tctgcaggag	ttggactttt	1440
tatttactgc	tcattcagtc	accagcttat	ttcgaggagg	tttttggtat	tgaatcagc	1500
aaggttggca	tgttgtctgc	ggtcccacac	ctggtcatga	caatcattgt	gcctatcggg	1560
gggcaaattg	cagactttct	aaggagcaag	caaattcttt	caacaactac	agtgcgaaag	1620
atcatgaact	gcgggggttt	tggcatggaa	gccacactgc	ttctggttgt	tggctactct	1680
catactagag	gggtggccat	ctccttcttg	tgcttgcag	tgggattcag	tggatttgct	1740
atctctggtt	tcaatgtgaa	ccacttggat	attgccccga	gatatgccag	tattctaatg	1800
ggcattttcaa	atggtgttgg	cacgctgtcg	ggaatggtct	gcccgatcat	tgttggtgca	1860
atgacgaaga	acaagtcccg	tgaagaatgg	cagtatgtct	tcctcatcgc	tgactgggtc	1920
cactatggtg	gagtcataat	ttatgcacta	tttgccctcag	gagagaagca	accttgggca	1980
gacctgagg	aaacaagcga	agaaaagtgt	ggcttcattc	atgaagatga	actggatgaa	2040
gaaacggggg	acatcactca	gaattacata	aattacggta	ccaccaaatc	ctacggcgcc	2100
acctcacagg	agaacggagg	ctggcctaac	ggctggggaga	aaaaggaaga	atttgtgcaa	2160
gaaagtgcgc	aagacgcgta	ctcctataag	gaccgagatg	attattcata	acgaagctag	2220
ttgctggatt	cctttgtagt	gtttgtgatt	aaattaattg	tgattgcaca	aatcattttt	2280
aagaaatgtg	gtgtaaacad	gtaaacacat	caaccaagca	agtcttgctg	ttcaaaaaat	2340
aataataata	tgaattcaaa	acagaccgtg	agagtcccat	caagtgcatt	ctgtggcggc	2400
agtcacgtga	cgccatttcc	attcaggcca	ttcgtccttt	tcgtttgtga	tttaaagggt	2460
tcctgtagaa	ataagtaggt	attcgttgga	tccatcacca	cgttagagag	tacaactaca	2520
acagttggca	catgtcatcc	tacggaagtt	aggaagccaa	agctactgga	ttatgtgaac	2580
tgcatattat	tatttattac	actggactgc	aaaatatccc	agggaaatcc	tgtctagaga	2640
catagtagaa	ctggaaagat	ggctagattg	ggtactgacg	ataatcattg	tgtgtatatc	2700
atggagtggc	tatatctttt	aattggagaa	ctatattgta	tagctagcaa	aattgtactg	2760
aattattact	aggagtgcac	agtgtgtgat	attttgtgat	cttccaaaag	cttatcttgc	2820
agtgttttgt	gaaacgcttg	ggcacaacaa	cttattttta	tgaacaagag	cttgtaaagg	2880
gaggagtatg	ctccatgctc	tcccattcac	tacctgacag	tatcaaacct	tcacatttca	2940
atgaaatcca	acgtccatgt	aacatatcac	atgacttttt	ttgcaaaaaa	gaatataaga	3000
agaaatagac	ttcaatgtat	tttttattac	aactttgtac	tggttgtaac	ttgcattagg	3060
aaaaatgatt	aatatatgta	taatcgtaaa	gaatctaata	aaaatttact	atgaagatat	3120
agcccttaaa	atgcaatatt	aacaacaaaa	atatatagaa	aatttagata	atcttccttg	3180

ataactagag	actatatgga	actcacacca	caaagctata	tataatatga	aaagataaac	3240
aatagagatt	gtatatgtag	acgattttat	gacctaatgt	cccattttaag	aggatatttgt	3300
cttgagtata	tagtaciaaag	tatattaaaa	ttatatctac	atccctgtat	atcttatata	3360
tatccactca	cacaaacata	acaaataactt	ttcacacaga	acaaaaaaca	agcatacacc	3420
taatgttggg	tttggggatt	gcaattttcta	ctttcataga	gtcatagaat	tttagatggg	3480
aaaaaaaaag	gcatttttgc	cgtcattttct	taatataatt	aattcaacag	gaactgcaac	3540
atgtgtgtac	caagcaataa	gtgcgaagca	taaacctgct	gtgtgtaaac	tatccccata	3600
ctgcttgtgg	tagcactgat	ttctttcttt	taaagaactt	aacatcggag	ctcttttaca	3660
tgttttgcgc	tgataagaat	gcacatccca	atttaacgca	aagtgtcacc	tggtgtgttt	3720
acctgtctgt	tttgggtatt	tggtctgttt	ggtgtcctgt	gctcttgact	ggaggccctg	3780
ctactgcgaa	tataaaacgt	gaagtttgtt	tctaaatgca	aaccactcct	gaccttaaga	3840
aactaaagtc	cctctctgct	ttgtgtctcc	aagtactatc	atgtgaccat	aacccttgct	3900
gtgctgagta	aaaagatgtg	aactgtcatt	ttgttgctgc	gaagcaagtg	ttaataaaat	3960
gttctattta	aaaaaaaaaa	aa				

Fig. 2d)

1	MESVKQRILA	PGKEGIKNFA	GKSLGQIYRV	LEKKQDNRET	IELTEDGKPL
51	EVPEKKAPLC	DCTCFGLPRR	YIIAIMSGLG	FCISFGIRCN	LGVAIVDMVN
101	NSTIHRGGKV	IKEKAKFNWD	PETVGMIHGS	FFWGYIITQI	PGGYIASRLA
151	ANRVFGAAIL	LTSTLNMLIP	SAARVHYGCV	IFVRILQGLV	EGVTYPACHG
201	IWSKWAPPLE	RSRLATTSFC	GSYAGAVIAM	PLAGILVQYT	GWSSVFYVYG
251	SFGMVWYMFV	LLVSYESPAK	HPTITDEERR	YIEESIGESA	NLLGAMEKFK
301	TPWRKFFTSM	PVYAIIVANF	CRSWTFYLLL	ISQPAYFEEV	FGFEISKVGM
351	LSAVPHLVMT	IIVPIGGQIA	DFLRKQILS	TTTVRKIMNC	GGFGMEATLL
401	LVVGYSHTRG	VAISFLVLAV	GFSGFAISGF	NVNHLDIAPR	YASILMGISN
451	GVGTLSGMVC	PIIVGAMTKN	KSREEWQYVF	LIAALVHYGG	VIFYALFASG
501	EKQPWADPEE	TSEEKCGFIH	EDELDEETGD	ITQNYINYGT	TKSYGATSQE
551	NGGWPNGWEK	KEEFVQESAQ	DAYSYKDRDD	YS	

Fig. 3)

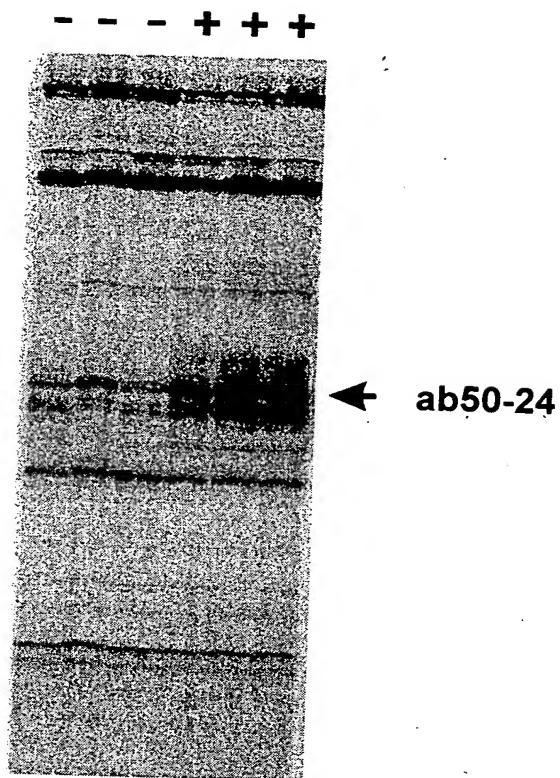
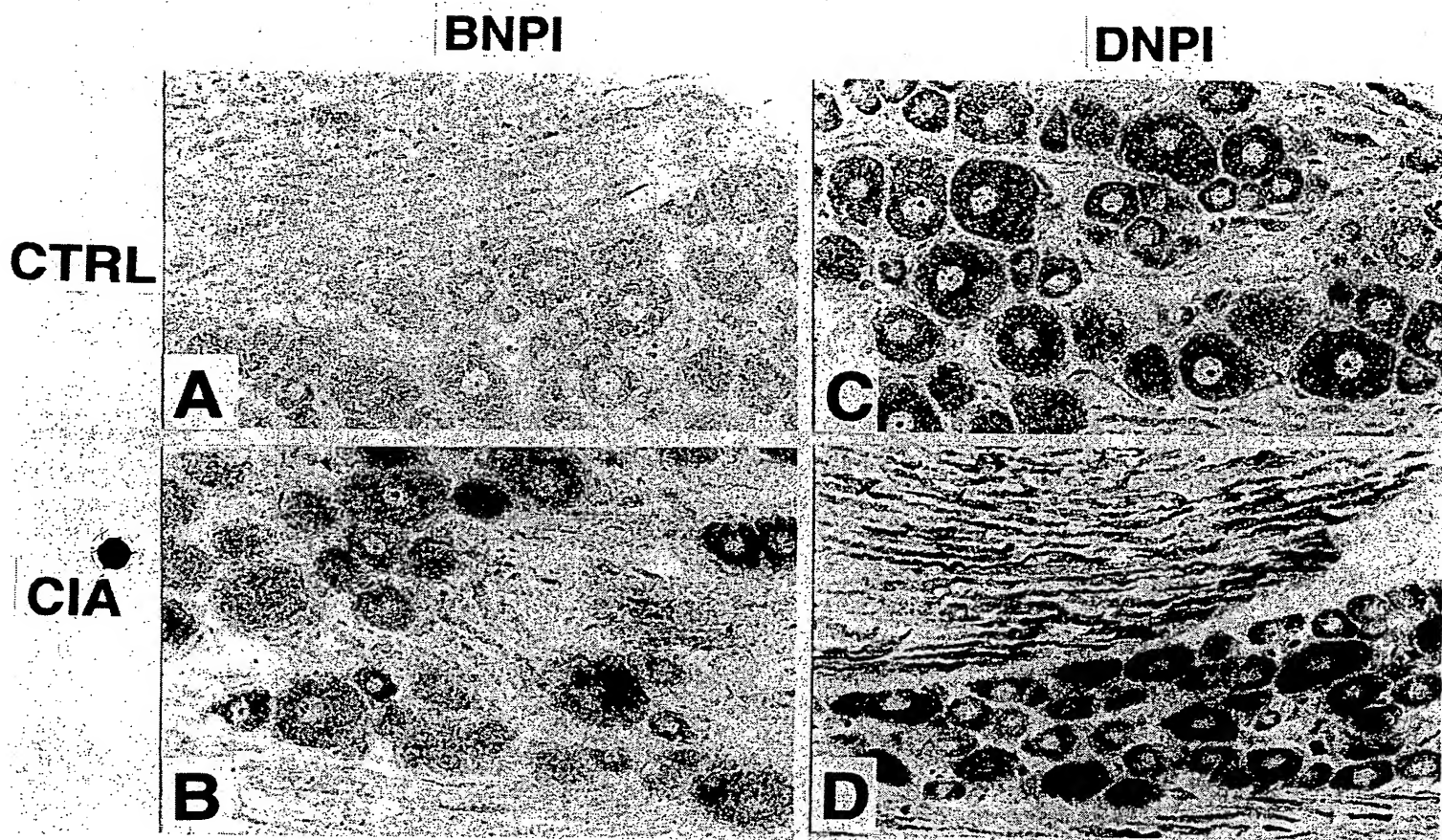
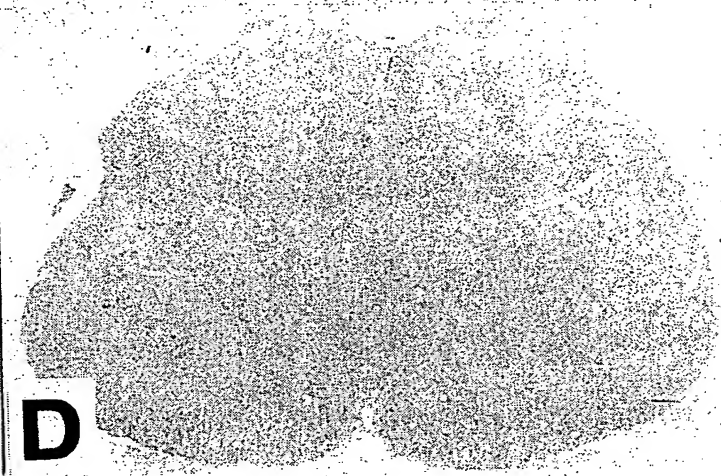
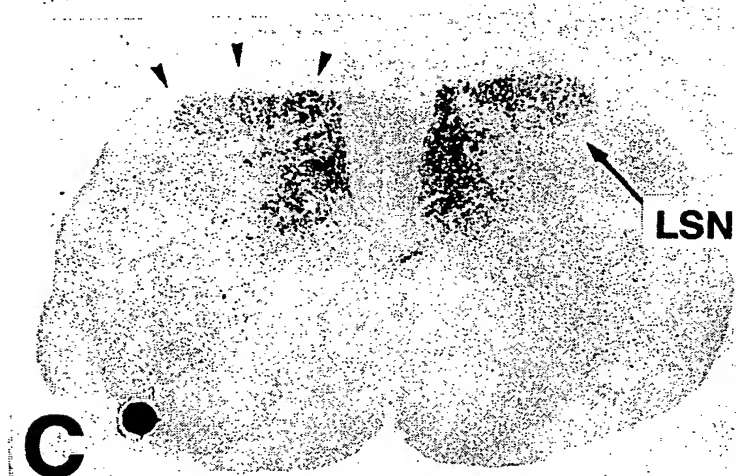
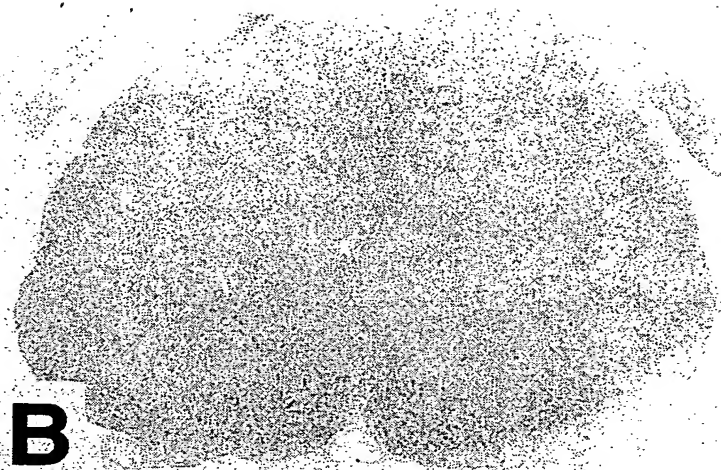
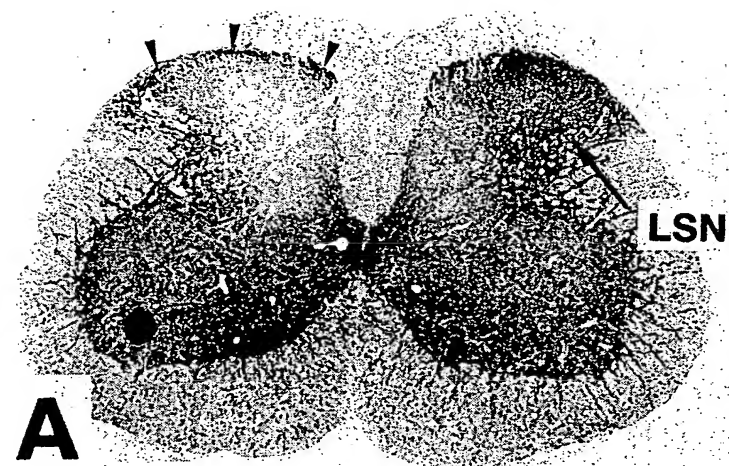


FIG. 4)



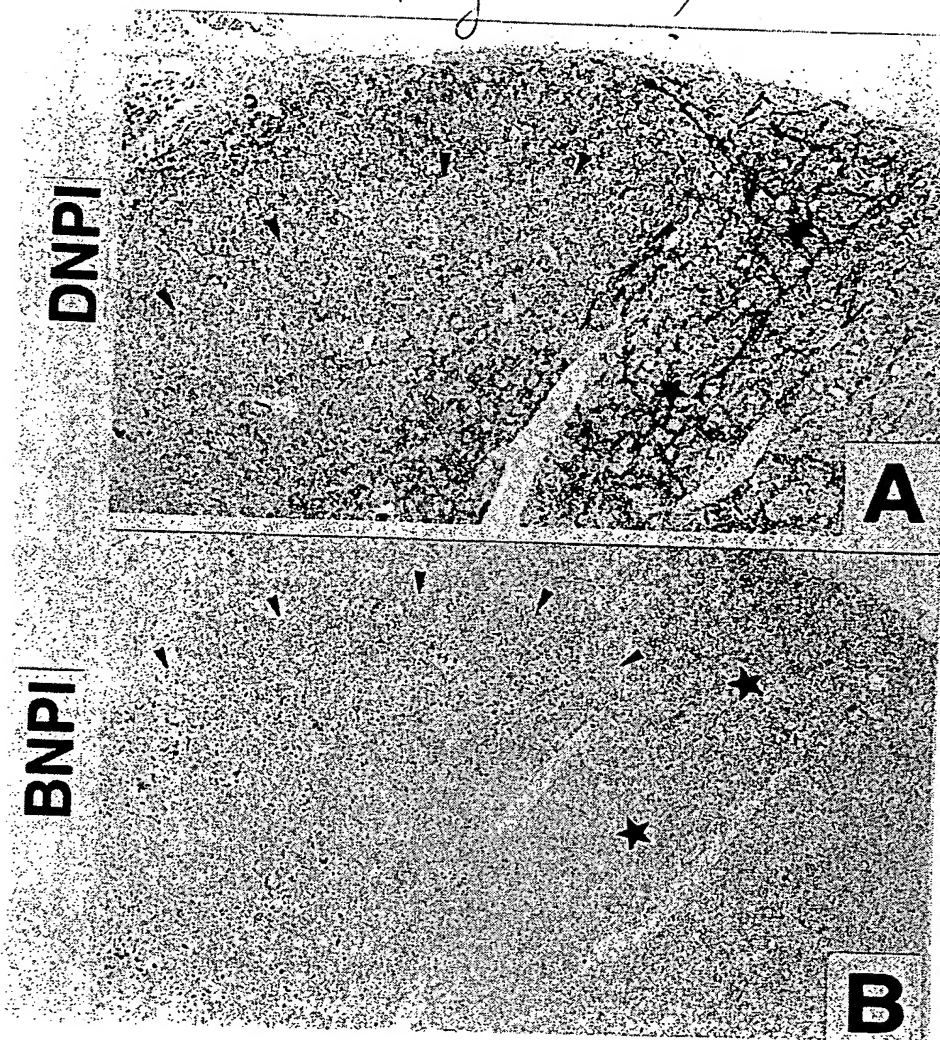
BEST AVAILABLE COPY

FIG 5)



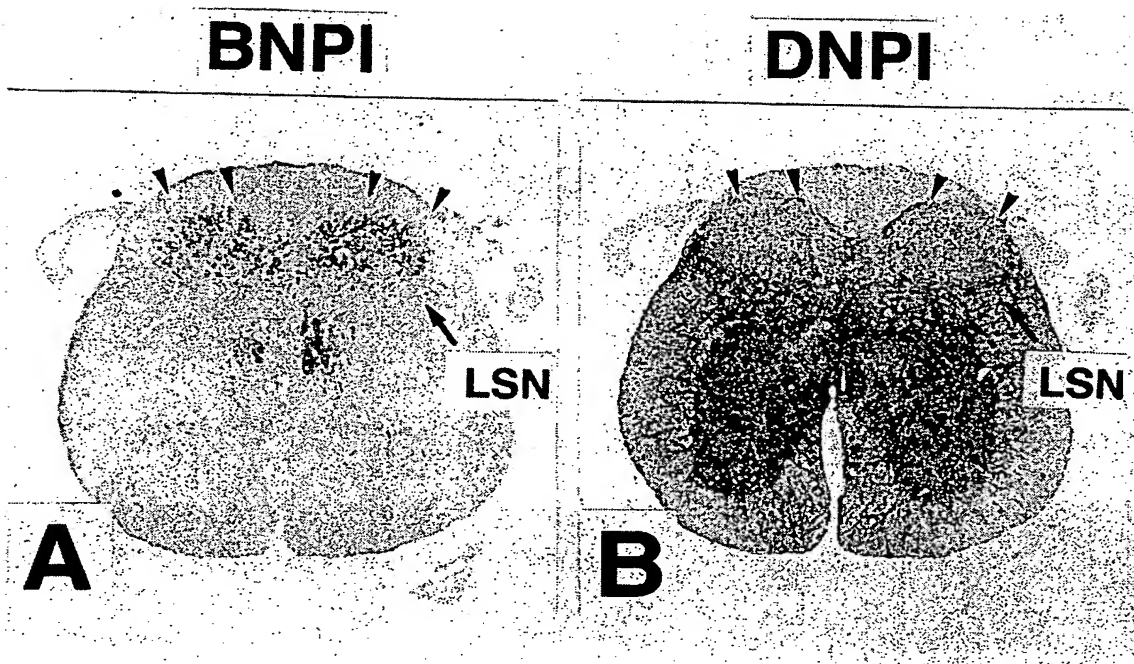
BEST AVAILABLE COPY

Fig. 6)



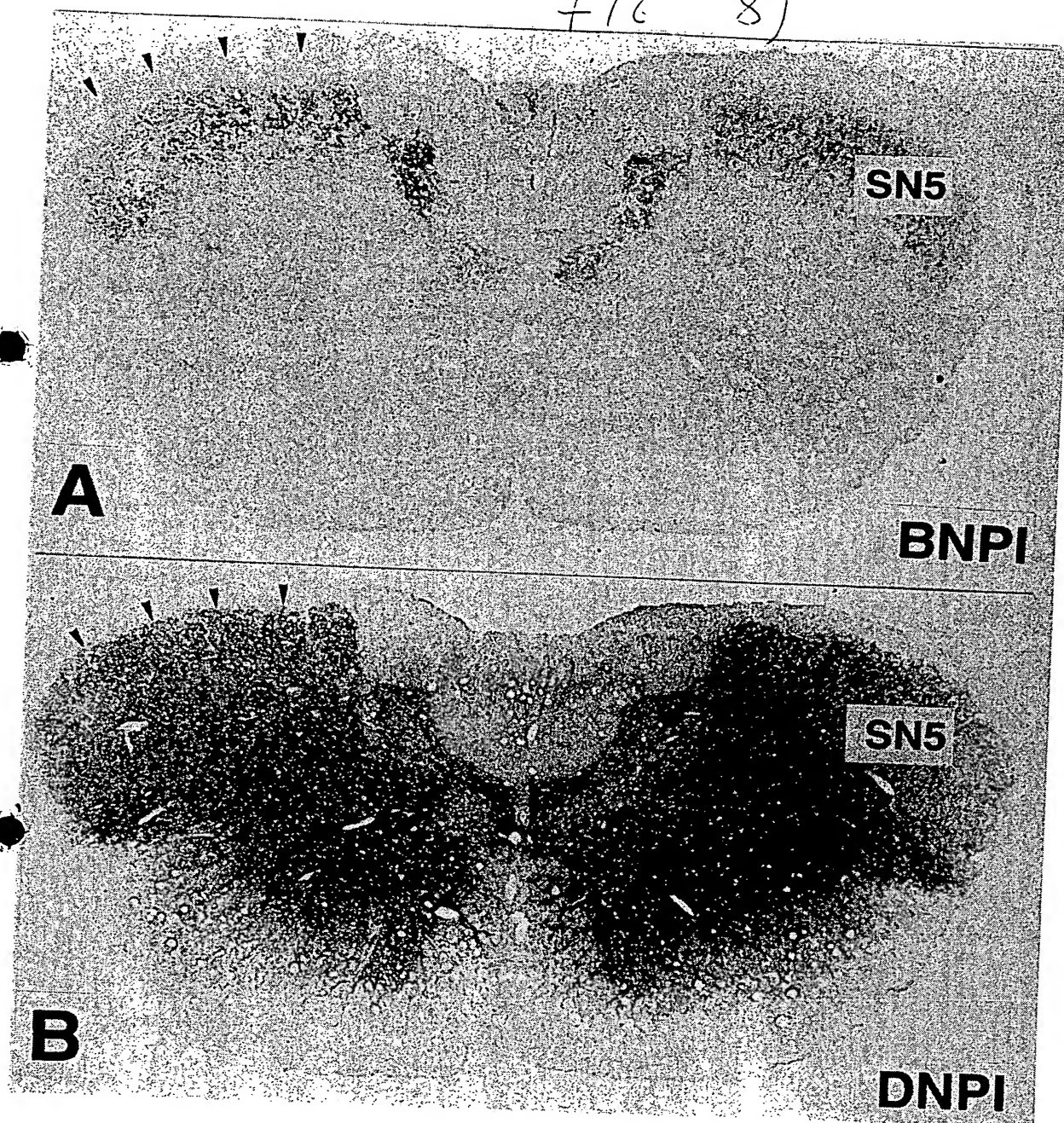
BEST AVAILABLE COPY

FIG 7)



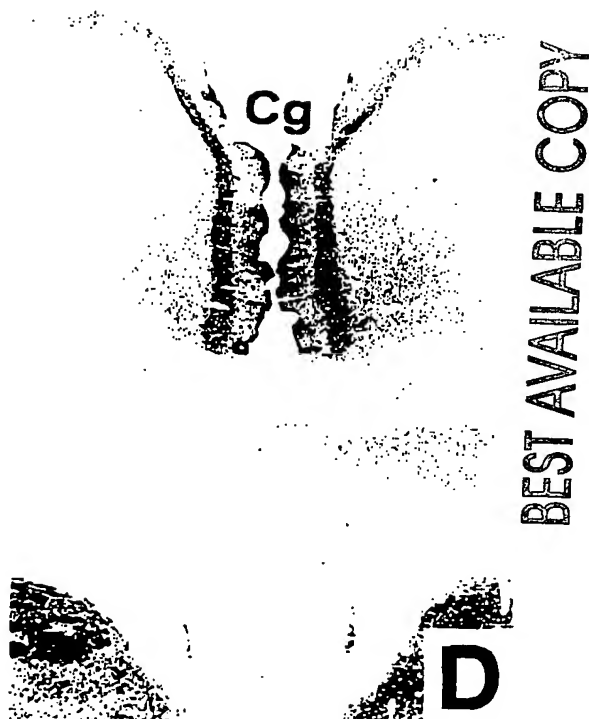
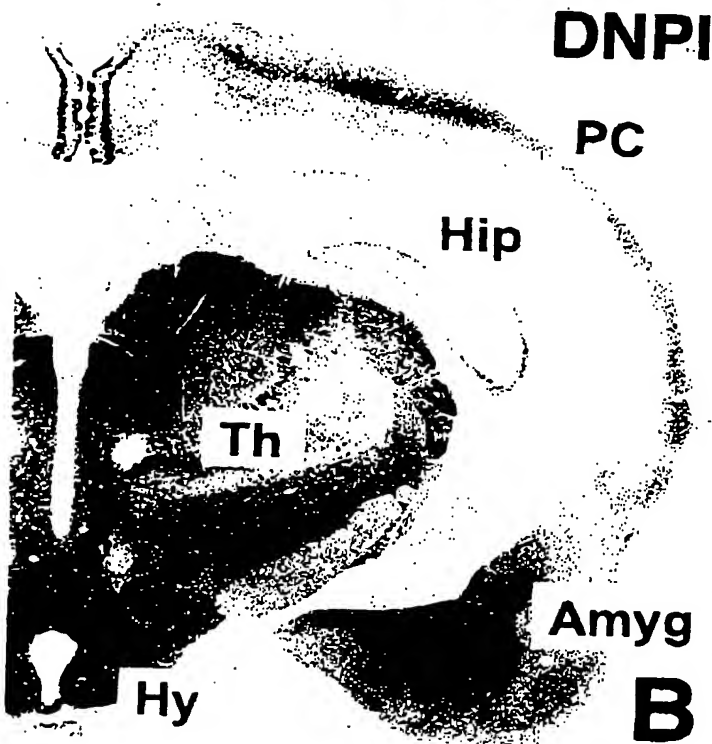
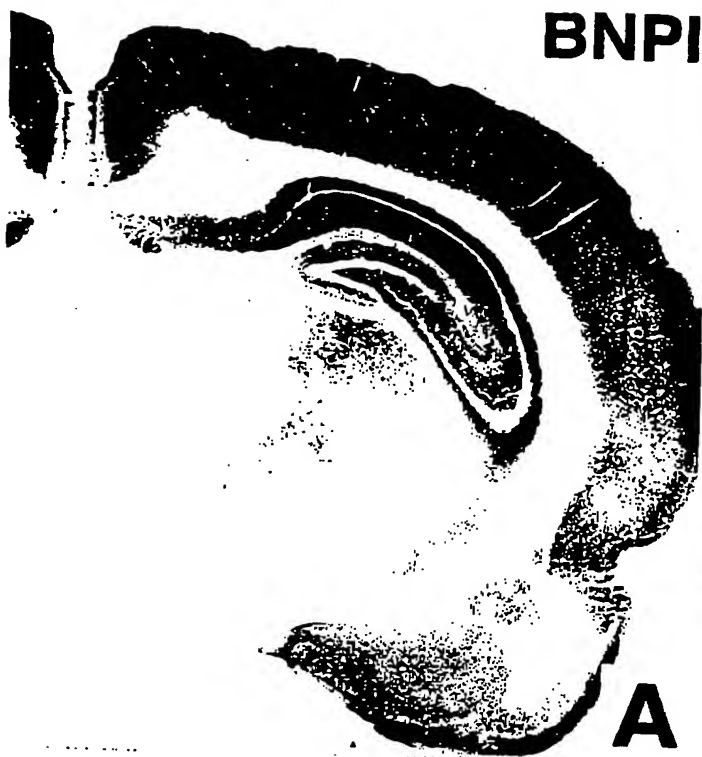
BEST AVAILABLE COPY

FIG 81



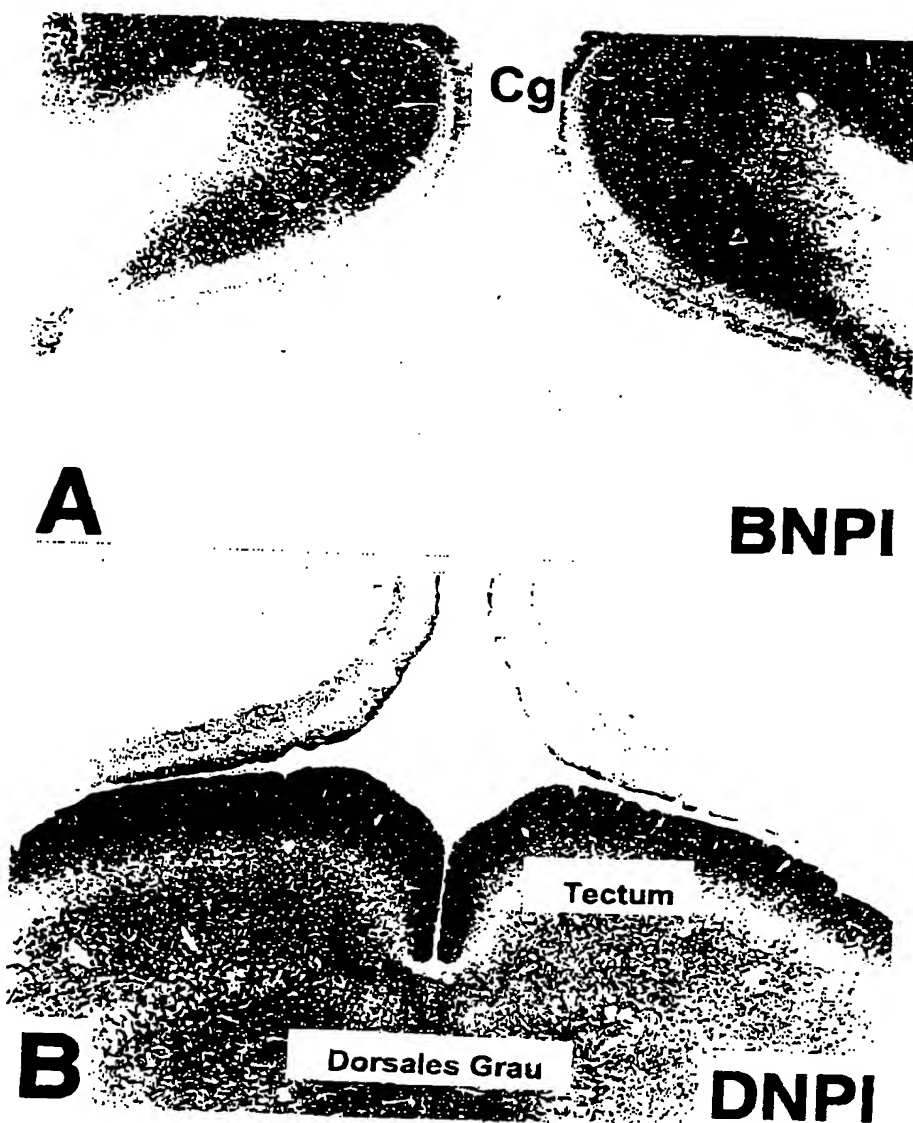
BEST AVAILABLE COPY

FIG. 9)



BEST AVAILABLE COPY

FIG 10)



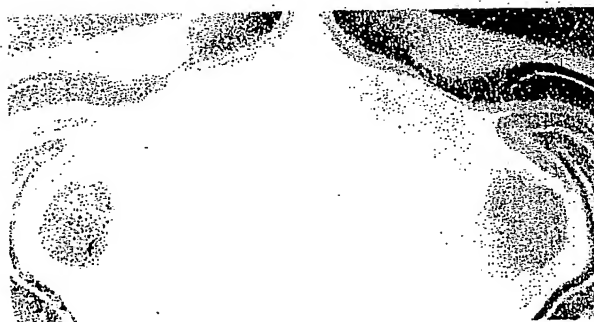
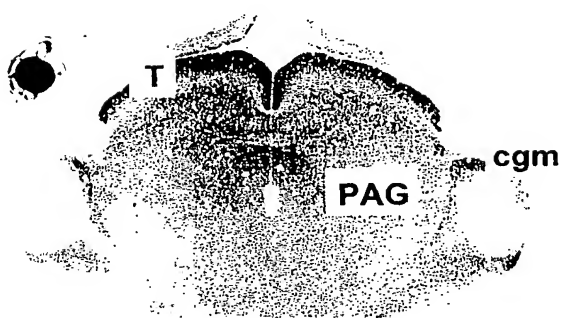
BEST AVAILABLE COPY

FIG 11/

BEST AVAILABLE COPY

DNPI

BNPI

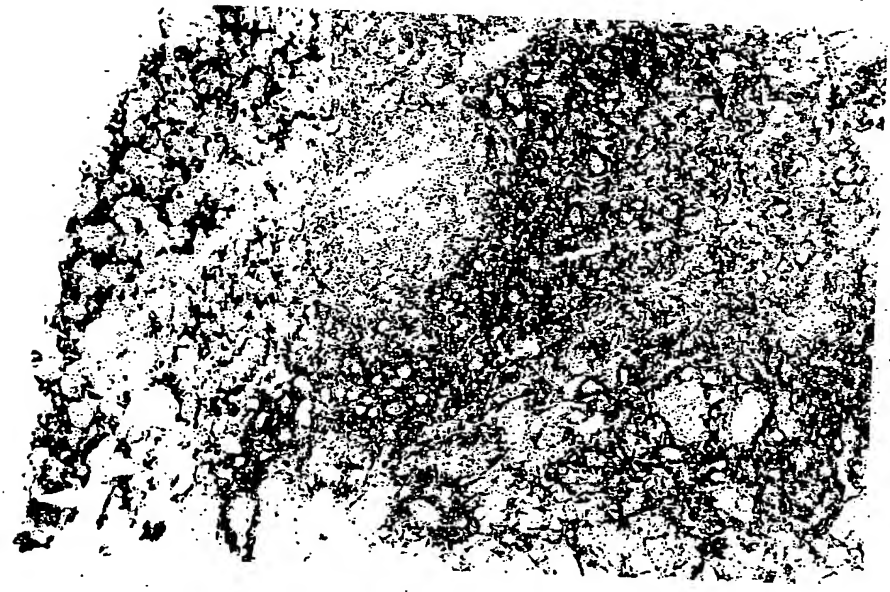


7(6 12)

DNPI

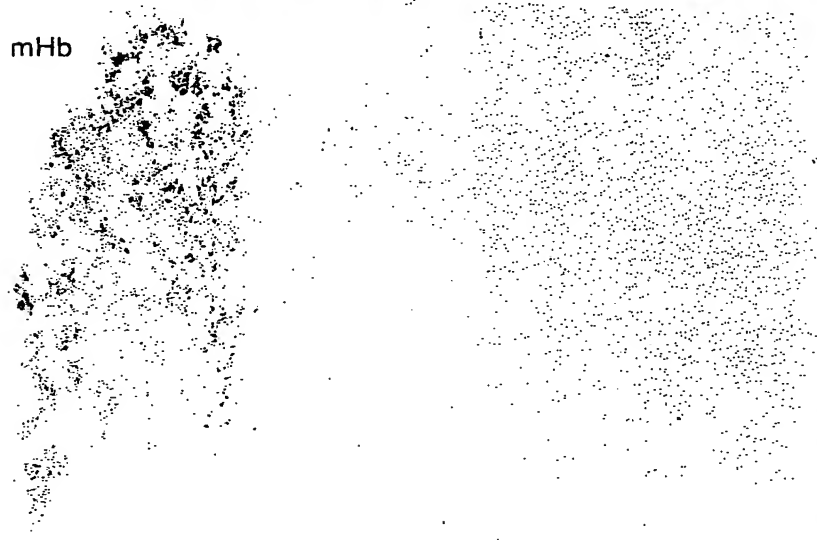


DNPI



mHb

BNPI



BEST AVAILABLE COPY

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Auffindung schmerzregulierender Substanzen unter Verwendung von BNPI und/oder DNPI und die
5 Verwendung dadurch identifizierter Verbindungen, an BNPI und/oder DNPI bindender Wirkstoffe, gegen BNPI und/oder DNPI gerichteter Antikörper, von Antisensenukleotiden gegen BNPI und/oder DNPI, oder von BNPI und/oder DNPI bzw. Teilproteinen davon, bzw. entsprechenden Polynukleotiden für Arzneimittel zur Schmerztherapie und Diagnostika.

10